

**DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE
PLAGUICIDAS PROBLEMÁTICOS EN
PRODUCTOS VEGETALES Y SUELOS
MEDIANTE CROMATOGRFÍA-
ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM**

Tesis Doctoral
Aránzazu Peruga Mínguez
Noviembre 2015

DIRECTORES

Joaquim Beltrán Arandes
Félix Hernández Hernández



UNIVERSITAT
JAUME·I



Universitat Jaume I

Departamento de Química Física y Analítica

Instituto Universitario de Plaguicidas y Aguas

**DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS PROBLEMÁTICOS
EN PRODUCTOS VEGETALES Y SUELOS MEDIANTE CROMATOGRFÍA-
ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM**

Tesis Doctoral

ARÁNZAZU PERUGA MÍNGUEZ

Noviembre 2015

Dr. **Félix Hernández Hernández**, Catedrático de Química Analítica, y Dr. **Joaquim Beltran Arandes**, Profesor Titular de Química Analítica, de la Universitat Jaume I de Castellon,

CERTIFICAN QUE: la Tesis Doctoral “DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS PROBLEMÁTICOS EN PRODUCTOS VEGETALES Y SUELOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA-ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM” ha sido desarrollada bajo su dirección, en el área de Química Analítica del Departamento de Química Física y Analítica de la Universitat Jaume I de Castellón, por **Aránzazu Peruga Mínguez**.

Lo que certificamos para los efectos oportunos en Castellón de la Plana, 21 de Julio de 2015.



Fdo. Dr. Félix Hernández Hernández



Fdo. Dr. Joaquim Beltran Arandes

Esta Tesis ha sido realizada, y consecuentemente será defendida, con el propósito de obtener el título de Doctorado en Química de la Universitat Jaume I.

Previamente a la defensa de la Tesis Doctoral, este trabajo ha sido evaluado por dos censores directamente relacionados con el área de investigación de Química Analítica, e independientes a nuestro grupo de investigación, Dra. Yolanda Picó García (Universitat de València) y la Dra. Manuela Hidalgo Muñoz (Universitat de Girona).

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores de tesis, Dr. Félix Hernández y Dr. Joaquim Beltrán, la oportunidad que me han brindado y el excelente apoyo técnico ofrecido, así como la confianza que han depositado en mí durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

A todos los compañeros con los que he coincidido en el IUPA durante estos años que han llegado a ser mis amigos.

Finalmente, y en especial, a mi familia por su apoyo incondicional.

RESUMEN

Actualmente, el uso de productos fitosanitarios para proteger a los cultivos está muy extendido. La presencia de residuos de estos compuestos en productos alimentarios y en el medioambiente puede suponer un riesgo para la salud de las personas y de los animales, así como para los ecosistemas, si no existen controles rigurosos sobre su uso. Para autorizar un plaguicida y controlar la presencia de sus residuos, la legislación europea establece límites máximos de residuos (LMR), que, a nivel comunitario, deben cumplirse para asegurar la protección de la salud. Aunque existen muchos métodos analíticos destinados a determinar plaguicidas de diversas familias de forma conjunta (métodos multirresiduales), en ocasiones se deben desarrollar métodos específicos para ciertos plaguicidas problemáticos que, por sus propiedades fisicoquímicas, requieren tratamientos especiales, y que en cualquier caso difícilmente se pueden incluir en los métodos multirresiduales.

En esta tesis, se han afrontado diferentes situaciones analíticas relacionadas con la determinación de plaguicidas problemáticos en matrices vegetales y suelos. Los compuestos estudiados no suelen incluirse en métodos multirresiduales, que son los preferidos en análisis de rutina, debido a las dificultades analíticas que presentan, principalmente por su baja estabilidad. Las técnicas utilizadas han sido la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas con analizadores de cuadrupolo (GC-MS, Q) y triple cuadrupolo (GC-MS/MS, QqQ), y la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con triple cuadrupolo (LC-MS/MS, QqQ).

En el **capítulo 1**, se presenta una introducción general sobre la problemática asociada al uso de plaguicidas y la importancia de desarrollar métodos adecuados de

análisis, basados en el acoplamiento cromatografía/espectrometría de masas, considerando las diferentes etapas del método analítico y algunos aspectos teóricos.

Los capítulos posteriores, muestran los trabajos experimentales realizados y se han agrupado en tres capítulos en función de la técnica cromatográfica y el analizador utilizado.

El **capítulo 2, artículo científico 1**, presenta el primer trabajo que se realizó, y se centra en el desarrollo de un método basado en la aplicación de la microextracción en fase sólida para la determinación de piretroides en muestras vegetales mediante GC-MS con cuadrupolo simple. Algunos de los piretroides incluidos en este estudio están clasificados como posibles agentes cancerígenos, por lo que su determinación es prioritaria. El método desarrollado fue validado en términos de precisión y linealidad, y se obtuvieron LODs en el rango de 0.003 y 0.025 mg/kg. La principal dificultad asociada al método desarrollado reside en la cuantificación de las muestras, cuestión que se discute en el trabajo.

En los siguientes capítulos puede verse el avance y mejora que supone el uso del analizador de triple cuadrupolo en términos de sensibilidad y robustez.

En el **capítulo 3**, se presentan dos trabajos basados en el uso de GC-MS/MS (QqQ). En el primero de ellos, **artículo científico 2**, se desarrolla un método para la determinación de residuos de clorotalonil en diversas matrices vegetales. El clorotalonil es un fungicida cuya dificultad analítica es conocida por la baja estabilidad que presenta durante la preparación de muestra. En el desarrollo del método, se hizo especial hincapié en la minimización y control de los factores que pueden provocar la degradación. El método desarrollado se basa en una extracción con acetona, añadiendo

EDTA como conservante, seguida de una purificación mediante SPE en fase inversa (OASIS HLB). Los resultados de validación en todas las matrices estudiadas fueron satisfactorios, obteniendo recuperaciones entre 77 y 110% y RSD por debajo del 20%. En el **artículo científico 3**, se desarrolla un método basado en HS-SPME para la determinación de metilisotiocianato (MITC) en suelos. El MITC es un compuesto muy volátil y elevadamente tóxico que se genera rápidamente tras la aplicación de determinados ditiocarbamatos, como el metam sodio. La metodología HS-SPME presenta la ventaja de extraer y concentrar los analitos en una sola etapa sin utilizar disolventes orgánicos, y permite la introducción directa y cuantitativa de los analitos extraídos en el GC. El método se validó obteniendo recuperaciones entre 76 y 92% y RSD del orden del 7%. Dado que el principal problema asociado a la técnica SPME es la cuantificación, en este trabajo se evaluó el potencial del MHS-SPME para realizar la cuantificación.

El **capítulo 4**, presenta dos trabajos basados en LC-MS/MS (QqQ). En el primero de ellos, **artículo científico 4**, se desarrolla un método para la determinación de residuos tiram en muestras vegetales. El tiram es un fungicida ditiocarbamato que se degrada rápidamente durante el proceso analítico generando, entre otros productos, CS₂. Por ello, se estudió cuidadosamente la etapa de extracción tratando de minimizar los factores que pueden favorecer la degradación, como la temperatura, contenido en agua, pH,... El método finalmente desarrollado consistió en una extracción con acetonitrilo sobre la muestra congelada, en presencia de NaSO₄ anhidro, EDTA y NaHCO₃ (sólo en el caso de matrices ácidas), tratando de mantener la cadena de frío durante todo el proceso mediante inmersión en baño de hielo a temperatura próxima a 5°C. Los resultados de la validación fueron buenos, obteniendo recuperaciones entre 80 y 106% y RSD inferiores al 10%. Finalmente, el **artículo científico 5**, presenta un método rápido

y sensible para la determinación de residuos de piretrinas en muestras vegetales. Las piretrinas son insecticidas naturales que se degradan fácilmente en presencia de agua y por acción de la luz solar y el calor. El objetivo principal del trabajo fue desarrollar un método que permitiera cuantificar de forma específica e individual cada piretrina a bajos niveles de concentración en diversas matrices vegetales (lechuga, pimiento, pepino, tomate, fresa, arroz, patata y pistacho). Estos compuestos se suelen determinar de forma conjunta, como suma de piretrinas, por lo que la posibilidad de determinarlos de forma individual, por separado, se presenta como un reto analítico. El método desarrollado se basó en extracción con acetona o mezcla de acetona/H₂O, en función de la matriz, e inyección directa del extracto en el sistema LC-MS/MS. En el caso de muestras grasas se evaluó el potencial de la interfase APCI. Finalmente, se consiguió un método robusto, con buenos resultados de validación en términos de exactitud y precisión.

Todos los trabajos desarrollados en esta tesis han tenido un componente aplicado importante con el fin de demostrar la aplicabilidad de la metodología analítica puesta a punto en el análisis de muestras reales.

SUMMARY

DETERMINATION OF PROBLEMATIC PESTICIDE RESIDUES IN VEGETABLES AND SOLIS BY CHROMATOGRAPHY-TANDEM MASS SPECTROMETRHY

Nowadays, the use of pesticides in crop protection has become extremely common. The presence of residues of these compounds in food and environment may pose a risk to population's health and ecosystems, so it is necessary a strict control in their use. In order to control the use of pesticides and authorise their commercialisation, the European Union sets the maximum residue levels for harmonisation and compliance in member states. Although there are numerous multiresidual analytical methods which include different families of pesticides, development of individual methods may still be necessary in the case of problematic compounds, which require specific treatments because of their physico-chemical properties, and, normally, they cannot be included in multiresidual methods.

In this Doctoral Thesis, different analytical challenges have been studied related with the determination of problematic pesticides in food, as fruits and vegetables, and soils. Compounds studied are rarely included in multiresidual methods because of their analytical difficulties due, mainly, to their instability. Gas and liquid chromatography coupled to mass spectrometry have been applied making use of quadrupole analyser in single mode, only in the case of gas chromatography (GC-MS, Q), and in triple quadrupole configuration (GC-MS/MS, LC-MS/MS, QqQ).

In **chapter 1**, a general introduction, focused on the problematic of the wide use of pesticides and the need for developing suitable analytical methods for their determination based on the chromatography/mass spectrometry, is presented.

Different stages of analytical method and some other theoretical issues are also considered.

The following chapters show the experimental work performed, divided in three different blocks according to the chromatographic technique and the MS analyser used.

Chapter 2, scientific paper 1, shows the first work done, which is based on the development of solid phase microextraction method for the determination of pyrethroids in vegetables by GC-MS (Q). Some of the pyrethroids included in this work are classified as carcinogenic, so its determination is critical. Validation was carried out in terms of linearity and precision, and LOD obtained were in the range of 0.003 to 0.0025 mg/kg. Quantification of samples was the main concern of the method, therefore it was discussed in the work.

Next chapters show the advance in sensitivity and robustness thanks to the use of triple quadrupole analyser in mass spectrometry.

Chapter 3 introduces two works focused on applications of GC-MS/MS (QqQ). In the first one, **scientific paper 2**, a method for determination of chlorothalonil residues in fruit and vegetable samples was developed. Chlorothalonil is a fungicide and its physico-chemical properties, make its determination difficult because of its instability during sample preparation. Method development was devoted to control factors which can cause chlorothalonil degradation in order to minimize it. Developed methodology is based on extraction with acetone in the presence of EDTA, and clean-up by reverse phase SPE using OASIS HLB cartridges. Validation results were satisfactory, with recoveries between 77% and 110%. RSD values were below 20%. In **scientific paper 3**, a headspace solid phase microextraction (HS-SPME) method was developed for

determination of methylisothiocyanate (MITC) in soils. MITC is highly toxic and volatile, that is quickly generated after the application of certain dithiocarbamates, as metam sodium. HS-SPME methodology has the advantage of performing the extraction and concentration of analytes in a single stage, without organic solvents, and moreover it allows complete and direct injection of extracted analytes in the GC. Developed method was validated obtaining recoveries between 76 and 92%, and RSD below 7%. Considering that quantification is the main issue in HS-SPME, the potential of quantify samples using multiple headspace solid phase microextraction (MHS-SPME) was evaluated.

Chapter 4 introduces two works focused on application of LC-MS/MS (QqQ). In the first one, **scientific paper 4**, a method for determination of thiram residues in fruit and vegetable samples was developed. Thiram is a fungicide which is quickly degraded during analytical procedure generating, among other products, CS₂. Because of this, extraction stage was carefully studied, in order to minimize degradation factors, as temperature, water content, pH,...The final method was based on chopping and direct extraction on frozen samples with acetonitrile in presence of NaSO₄ anhydrous, EDTA and NaHCO₃ (only in the case of acid matrices), emphasizing the importance of maintaining low temperatures along the overall process (5°C), by immersing the material in an ice bath. Validation results were satisfactory, obtaining recoveries between 80 and 106% and RSD below 10%. Finally, **scientific paper 5** shows a rapid and sensitive method for pyrethrins residue determination in vegetables. Pyrethrins are natural insecticides which are degraded easily in presence of water and by the action of sunlight. The main objective of this work was to develop a methodology which allowed the specific and individual quantification of each pyrethrin at trace levels in several fruit and vegetable samples (lettuce, pepper, cucumber, tomato, strawberry, rice, potato and

pistachio). These compounds are usually determined together, thus the possibility to determine them individually is an interesting analytical challenge. Developed method was based on extraction with acetone or acetone/H₂O, depending on sample type, and direct injection of the raw extract in the LC-MS/MS system. In the case of fat samples, the potential of the interface APCI was evaluated. Finally, a robust and reliable method, with satisfactory validation results in terms of accuracy and precision, was developed.

Each developed work in this Thesis has an important applied purpose, in order to demonstrate the applicability of the analytical methodology in the real sample analyses.

ÍNDICE GENERAL

	<u>Pág.</u>
Objetivos	1
Objectives	5
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL	9
1.1 Introducción	11
1.1.1. Residuos de plaguicidas	11
1.1.2. Buenas prácticas de laboratorio	14
1.2 Problemática analítica	17
1.3 Acoplamiento cromatografía-espectrometría de masas	27
1.3.1 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas	27
1.3.2 Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas	32
1.3.3 Analizadores de espectrometría de masas: Cuadrupolo y triple cuadrupolo	37
1.3.4 Efecto matriz	41

CAPÍTULO 2. ACOPLAMIENTO GC-MS 45

2.1	<u>Capítulo 2.1.</u> Determinación de residuos de piretroides en muestras vegetales mediante microextracción en fase sólida seguida de GC-MS	47
-----	--	----

2.1.1	Introducción	49
-------	--------------------	----

2.1.2	Artículo científico 1	53
-------	-----------------------------	----

Application of solid-phase microextraction for the determination
of pyrethroid residues in vegetable samples by GC-MS

Analytical and Bioanalytical Chemistry (2003) 376: 502–511

2.1.3	Discusión de resultados	85
-------	-------------------------------	----

CAPÍTULO 3. ACOPLAMIENTO GC-MS/MS 93

3.1	<u>Capítulo 3.1.</u> Determinación de residuos de clorotalonil en frutas y vegetales por GC-MS/MS	95
-----	--	----

3.1.1	Introducción	97
-------	--------------------	----

3.1.2	Artículo científico 2	101
-------	-----------------------------	-----

A robust GC-MS/MS method for the determination of chlorothalonil in
fruits and vegetables

Food Additives & Contaminants: Part A (2013) 30(2): 298-307

3.1.3	Discusión de resultados	131
3.2	<u>Capítulo 3.2.</u> Determinación de metilisotiocianato en suelos y agua mediante HS-SPME seguido de GC-MS/MS	139
3.2.1	Introducción	141
3.2.2	Artículo científico 3	145
	Determination of methylisothiocyanate in soil and water by HS-SPME followed by GC–MS–MS with a triple quadrupole Analytical and Bioanalytical Chemistry (2014) 406: 5271–5282	
3.2.3	Discusión de resultados	183
CAPÍTULO 4. ACOPLAMIENTO LC-MS/MS		193
4.1	<u>Capítulo 4.1.</u> Determinación de residuos de tiram en frutas y vegetales por LC-MS/MS	195
4.1.1	Introducción	197
4.1.2	Artículo científico 4	203
	Optimisation and validation of a specific analytical method for the determination of thiram residues in fruits and vegetables by LC–MS/MS Food Chemistry (2012) 135: 186-192	
4.1.3	Discusión de resultados	231

4.2	<u>Capítulo 4.2.</u> Determinación individual de residuos de piretrinas en frutas y vegetales por LC-MS/MS	241
4.2.1	Introducción	243
4.2.2	Artículo científico 5	247
	Development of a fast analytical method for the individual determination of pyrethrins residues in fruits and vegetables by liquid chromatography– tandem mass spectrometry Journal of Chromatography A (2013) 1307: 126–134	
4.2.3	Discusión de resultados	281
	CAPÍTULO 5. BIBLIOGRAFÍA	291
	CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES GENERALES	321
	CHAPTER 6. GENERAL CONCLUSIONS	327
	Sugerencias para futuros trabajos	333

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

AP	Protector de los Analitos
API	Ionización a Presión Atmosférica
APCI	Ionización Química a Presión Atmosférica
BPA	Buenas Prácticas Agrícolas
BPL	Buenas Prácticas de Laboratorio
CAR	Carboxen
CI	Ionización Química
CID	Disociación Inducida por Colisión
DCI	Corriente Continua
DI	Inmersión Directa
DTC	Ditiocarbamato
DVB	Divinilbenceno
ECD	Detector de Captura de Electrones
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
EEUU	Estados Unidos
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria

EI	Ionización Electrónica
ENAC	Entidad Nacional de Acreditación
EPA	Agencia Estatal de Protección del Medioambiente de los Estados Unidos
ESI	Electrospray
EU	Unión Europea
FID	Detección Fotométrica de Llama
FTMS	Resonancia Ciclotrónica con Transformada de Fourier
GC	Cromatografía de Gases
HCB	Hexaclorobenceno
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
HS	Espacio de Cabeza
IS	Patrón Interno
IT	Trampa de Iones
LARP	Laboratorio de Análisis de Residuos de Plaguicidas
LC	Cromatografía Líquida
LIT	Trampa de Iones Lineal
LLE	Extracción Líquido-Líquido

LMR	Límite Máximo de Residuo
LOC	Límite de Confirmación
LOD	Límite de Detección
LOQ	Límite de Cuantificación
MAE	Extracción Asistida por Microondas
MS	Espectrometría de Masas
MS/MS	Espectrometría de Masas en Tandem
MSPME	Múltiple Microextracción en Fase Sólida
m/z	Relación masa/carga
NCI	Ionización Química Negativa
NL	Pérdida Neutra
NPD	Detector Nitrógeno-Fósforo
OCDE	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos
PA	Poliacrilato
PCI	Ionización Química Positiva
PDMS	Polidimetilsiloxano
PEG	Polietilenglicol

PFE	Extracción con Fluido Presurizado
PNT	Procedimiento Normalizado de Trabajo
PTV	Vaporización de Temperatura Programable
Q	Cuadrupolo
QqQ	Triple Cuadrupolo
QuEChERS	Rápido, Fácil, Barato, Efectivo, Robusto y Seguro
RF	Radiofrecuencia
RSD	Desviación Estándar Relativa
SIM	Monitorización Selectiva de Iones
S/N	Relación Señal/Ruido
SPE	Extracción en Fase Sólida
SPME	Microextracción en Fase Sólida
SRM	Monitorización Selectiva de Transiciones
TOF	Tiempo de Vuelo
UHPLC	Cromatografía Líquida de Ultra Presión

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El desarrollo de los métodos analíticos se ha enfocado a compuestos problemáticos que, por su baja estabilidad durante la aplicación de las diferentes etapas del proceso analítico, no suelen dar buenos resultados en métodos multirresiduales, y requieren tratamientos especiales. La toxicidad asociada a algunos de los compuestos seleccionados (MITC, clorotalonil, bifentrin, cipermetrin y permetrin) es elevada por lo que su determinación, a bajos niveles, es prioritaria. Con objeto de desarrollar una metodología con elevada robustez, sensibilidad y selectividad, se han seguido diversas estrategias haciendo uso del acoplamiento GC-MS, GC-MS/MS y LC-MS/MS, con analizadores de tipo cuadrupolo simple y triple cuadrupolo. Los métodos desarrollados han sido validados, en la mayoría de los casos, siguiendo las guías SANCO de la Unión Europea, y también se han aplicado al análisis de muestras reales haciendo hincapié en la confirmación de las muestras positivas.

El objetivo principal de la presente Tesis Doctoral es el desarrollo, validación y aplicación de metodología analítica avanzada para la determinación de residuos de plaguicidas problemáticos en matrices vegetales y medioambientales mediante el acoplamiento de cromatografía de gases y de líquidos con la espectrometría de masas.

Los objetivos específicos establecidos en esta Tesis Doctoral se indican a continuación:

1. Desarrollo de metodología analítica basada en SPME seguida de GC-MS para la determinación de piretroides seleccionados (bifentrin, lambda-cihalotrin, ciflutrin, cipermetrin, fenvalerato, tau-fluvalinato y permetrin)

- en muestras de tomate y fresa. Evaluar la capacidad del método para monitorizar la presencia de residuos de los piretroides objeto de estudio.
2. Desarrollo de metodología analítica robusta para la determinación de clorotalonil en matrices vegetales. Optimizar las variables minimizando la degradación/pérdida durante la etapa de extracción. Validación del método y aplicación a muestras reales.
 3. Desarrollo de metodología analítica basada en HS-SPME seguida de GC-MS/MS para la determinación de MITC en suelos. Evaluación del potencial de la aproximación MHS-SPME para realizar la cuantificación. Diseño de un procedimiento de cuantificación. Validación del método.
 4. Desarrollo de metodología analítica robusta para la determinación de tiram en muestras vegetales. Estudio de la optimización de la extracción con el fin de minimizar los factores de degradación. Validación del método y aplicación a muestras reales.
 5. Desarrollo de metodología analítica simple para la determinación y cuantificación individual de piretrinas en diversas matrices vegetales. Optimización y diseño del método con dos transiciones por analito con adecuadas características cualitativas y cuantitativas. Validación del método. Aplicación a muestras reales.

OBJECTIVES

OBJECTIVES

Development of analytical methodology is focused on problematic pesticides, which don't achieve satisfactory results in multiresidual methods, because of their low stability during sample processing, and for which specific procedures are needed. Toxicity of some of selected compounds (MITC, chlorothalonil, bifenthrin, cypermethrin and permethrin) is quite high, so determination at low levels is critical. In order to develop a robust, sensitive and selective methodology, GC-MS, GC-MS/MS and LC-MS/MS techniques have been applied with single and triple quadrupole analysers. Most of developed methods have been validated following SANCO guidelines, and moreover, they have been applied to real sample analyses emphasizing in confirmation of positive samples.

The main objective of this Thesis is the development, validation and application of advanced analytical methodologies based on gas and liquid chromatography coupled to mass spectrometry, for the determination of pesticides that are problematic from an analytical point of view in vegetable and soil samples.

The specific objectives pursued in this Thesis are the following:

1. Development of analytical methodology based on SPME followed by GC-MS for determination of selected pyrethroids (bifenthrin, lambda-cyhalothrin, permethrin, cyfluthrin, cypermethrin, fenvalerate and tau-fluvalinate) in tomato and strawberry samples. Evaluation of method ability for monitoring the presence of selected compounds residues.

2. Development of robust analytical methodology for the determination of chlorothalonil residues in fruit and vegetable samples. Optimization of extraction variables in order to minimize chlorothalonil degradation. Method validation and real sample analysis.
3. Development of analytical methodology for MITC determination in soils based on HS-SPME followed by GC-MS/MS. Evaluation of the potential of MHS-SPME approximation for quantification. Design of a quantification procedure. Method validation.
4. Development of analytical methodology for thiram determination in vegetable samples. Optimization of extraction variables in order to minimize degradation. Method validation and real sample analysis.
5. Development of simple analytical methodology for individual determination of pyrethrins in several fruit and vegetable samples. Method design and optimization with two adequate transitions for each analyte with suitable qualitative and quantitative characteristics. Method validation and real sample analysis.

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. INTRODUCCIÓN

La protección de la salud es un aspecto prioritario de la política de seguridad alimentaria de la Unión Europea. A principios de la década del 2000 se creó la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), cuya misión es asegurar un nivel elevado de protección de la salud de las personas y de los intereses de los consumidores en relación con los alimentos (Regulation (EC) No 178/2002), incluyendo tanto aquellos producidos en los países miembros como los que son importados del exterior. En este ámbito, para prevenir todo riesgo en la alimentación humana y animal se presta especial atención a la protección de las plantas y cultivos. Aunque el uso de productos fitosanitarios en la producción agrícola es necesario, debido a que muchos cultivos pueden verse inhabilitados por el ataque de diversas plagas tanto en el campo como durante el almacenamiento, puede tener efectos no deseados sobre la salud humana, animal y el medioambiente. Con el fin de prevenir posibles riesgos, la comercialización de los productos fitosanitarios se realiza previa autorización por la Unión Europea y requiere de numerosos ensayos para asegurar que su uso no es nocivo. Estos ensayos incluyen estudios sobre los efectos en la salud de las personas y animales y en el medioambiente, así como sobre la presencia de residuos en los alimentos.

1.1.1 Residuos de plaguicidas

Los plaguicidas están constituidos por uno o varios ingredientes activos o formulaciones de éstos, de naturaleza orgánica o inorgánica, natural, sintética o biológica, y su actividad está destinada a combatir plagas. El término plaga incluye insectos, malas hierbas, pájaros y microbios entre otros, que actúan destruyendo las siembras y propagando enfermedades entre los cultivos. La aplicación de plaguicidas sobre los cultivos se realiza mediante formulados líquidos o sólidos, constituidos

principalmente por cuatro componentes, que son: el ingrediente activo; la materia inerte, que permite la dilución y mejor distribución del ingrediente activo; los coadyuvantes, que mejoran las propiedades del producto a fin de favorecer su distribución en la planta; y los aditivos, que modifican las propiedades del ingrediente activo, como por ejemplo el olor o el color. En función de su acción específica, se pueden encontrar diversas clasificaciones, aunque una de las más utilizadas es la que se indica a continuación, basada en la acción que ejercen sobre los organismos diana (Bartual, 1985):

- I. Insecticidas
- II. Acaricidas
- III. Fungicidas
- IV. Nematocidas, desinfectantes y fumigantes en general
- V. Herbicidas
- VI. Fitorreguladores y productos afines
- VII. Molusquicidas, rodenticidas y varios
- VIII. Específicos post-cosecha y simientes
- IX. Protectores de maderas, fibras y derivados
- X. Plaguicidas específicos varios

Se consideran residuos de plaguicidas a los restos de ellos y de los productos tóxicos, resultado de su metabolización y degradación, que permanecen en los alimentos que han recibido tratamiento fitosanitario. El límite máximo de residuo (LMR) es el nivel máximo de residuo de un plaguicida que se considera legal en productos alimentarios cuando el plaguicida ha sido aplicado siguiendo los principios de buenas prácticas agrícolas (BPA). Con el establecimiento de los LMR se pretende que la posible

exposición de los consumidores a los plaguicidas, a través de los alimentos, esté bajo control y que los residuos que puedan estar presentes sean aceptables desde el punto de vista de la protección de la salud (European Commission, 2015b). La existencia de diferencias en los LMR nacionales puede crear obstáculos en el comercio de productos, por ello la Unión Europea ha establecido, mediante el Reglamento (CE) No 396/2005 (Regulation (EC) No 396/2005), los LMRs comunitarios para los plaguicidas autorizados en alimentos de origen vegetal y animal, destinados al consumo humano y animal, con vistas a proteger también a grupos vulnerables como los niños y los no nacidos. Éste no es un proceso simple y los LMRs se establecen, previa consulta a EFSA, después de numerosos estudios tanto de las propiedades de la sustancia activa como de los niveles de residuos resultantes tras la aplicación de las BPA, siempre demostrando que los residuos no exceden los valores toxicológicos de referencia para el consumidor. Por otro lado, una vez establecidos, es necesario llevar un seguimiento constante a posteriori, a fin de que puedan modificarse, si fuera necesario, en función de nuevos datos disponibles.

La autorización de un producto fitosanitario se limita a aquellos que contengan sustancias activas aceptadas en base a sus propiedades toxicológicas, impacto medioambiental y eficacia (Regulation (EC) No 1107/2009). Para ello, ha sido necesario establecer un complejo procedimiento comunitario en el que se especifica la información requerida para incluir un plaguicida en la lista comunitaria de productos autorizados. El procedimiento general suele durar entre 2 y 3 años y consta de siete etapas (European Commission, 2015a):

1. Solicitud de autorización del plaguicida en uno o varios países de la Unión Europea

2. Verificación de si la solicitud es aceptable
3. Elaboración de un informe que evalúe los resultados
4. Evaluación del informe por EFSA y emisión de sus conclusiones
5. Emisión de votos a favor o en contra de su aprobación por el Comité Permanente de la Cadena Alimentaria y de Sanidad Animal
6. Aprobación por la Comisión Europea
7. Publicación de una Regulación en el Boletín Oficial de la Unión Europea

La lista comunitaria de sustancias activas se revisa periódicamente sobre la base de los avances en el conocimiento y de los estudios de impacto relativos a la utilización efectiva de los productos que contienen dichas sustancias.

1.1.2 Buenas Prácticas de Laboratorio

Tal como se ha mencionado anteriormente, la autorización de los plaguicidas requiere de la realización de diferentes estudios que, necesariamente, deben realizarse en cumplimiento de los estándares de calidad establecidos en los principios de las buenas prácticas de laboratorio (BPL).

Las BPL son un sistema de calidad que concierne a la organización de los procesos y las condiciones bajo las cuales deben planificarse, realizarse, controlarse, registrarse, archivarse y difundirse los estudios no clínicos de salud y medioambiente. Los principios de las BPL se establecen en una serie de monografías de la Organización de Cooperación y Desarrollo Económico (OCDE). Se desarrollaron por primera vez por un grupo de expertos de diversos países en 1978, en un programa especial para control de productos

químicos. La recomendación formal del uso de los principios BPL en los países miembros de la OCDE se realizó en 1981, con objeto de que los datos generados en un país miembro de acuerdo con las guías y principios de las BPL fueran aceptados en otros estados miembros con la finalidad de proteger la salud humana y el medioambiente. En 1997, el comité de expertos se amplió a más países, entre ellos España, y se reunió de nuevo para actualizar estos principios y adecuarlos a los avances tecnológicos, así como para extenderlos a aquellas áreas que en la década de 1970 no requerían estos estudios (OECD, 1998).

Los principios de las BPL son aplicables a los ensayos no clínicos que se realizan para obtener datos acerca de las propiedades e inocuidad sobre la salud humana y medioambiente de las sustancias activas contenidas en plaguicidas, productos farmacéuticos, cosméticos, medicamentos veterinarios, aditivos para la alimentación humana y animal y de los productos químicos industriales, y que son requeridos por la legislación a la hora de autorizar estos productos (OECD, 1998).

El Ministerio de Agricultura y Medioambiente establece el programa de cumplimiento de BPL (MAGRAMA, 2014) para los productos fitosanitarios (Reglamentos (UE) 283/2013 y 284/2013) y aditivos para piensos (Reglamento (UE) 429/2008), con objeto de vigilar mediante inspecciones y verificación de estudios el cumplimiento de las BPL de las entidades de ensayo que hay en el territorio español. En este programa se establecen los requerimientos relativos a: organización y personal de la entidad de ensayo; programa de garantía de calidad; instalaciones, aparatos, reactivos y materiales; sistemas experimentales; productos de ensayo y de referencia; procedimientos normalizados de trabajo (PNT); realización de un estudio; información de los resultados del estudio; y archivo y conservación de registros y materiales.

Según la OCDE, de acuerdo con el programa de cumplimiento BPL, los estudios BPL se clasifican en las siguientes áreas de ensayo:

- 1- Ensayos físico-químicos
- 2- Estudios de toxicidad
- 3- Ensayos mutagénicos
- 4- Estudios ecotoxicológicos sobre organismos acuáticos y terrestres
- 5- Estudios de comportamiento en agua, suelo y aire
- 6- Residuos
- 7- Estudios de efecto en ecosistemas naturales
- 8- Bioquímica clínica y química analítica
- 9- Otros estudios

En el caso de productos fitosanitarios, cabe destacar la necesidad de realizar ensayos destinados a la determinación de residuos, ya que es el ámbito en el que se desarrollan algunos trabajos de la presente Tesis. En general, estos estudios constan de una fase de campo y una fase analítica realizadas según las BPL, pudiendo ser evaluado el comportamiento del producto mediante la realización de curvas de disipación y/o directamente determinando la concentración a tiempo de cosecha.

Esta Tesis se ha efectuado íntegramente en el Laboratorio de Análisis de Residuos de Plaguicidas (LARP) de la Universitat Jaume I de Castellón. El LARP está certificado en

BPL en el ámbito de análisis de residuos de plaguicidas desde el año 2001 por la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC), para la realización de estudios de productos fitosanitarios con fines de autorización y registro según establece la Directiva 91/414/CEE. Esta certificación se renueva periódicamente tras superar los procesos de inspección por parte de ENAC.

1.2. PROBLEMÁTICA ANALÍTICA

Durante el siglo XX el avance instrumental en química analítica ha sido tan importante que, hoy en día, su aplicación resulta imprescindible en ámbitos como el medioambiental, forense, farmacéutico y seguridad alimentaria, entre otros. La problemática del análisis de muestras complejas reside en la habilidad para desarrollar un método analítico adecuado en base a las propiedades y concentración de los analitos, así como a las características de la matriz.

El primer inconveniente que aparece en el campo del análisis de residuos de plaguicidas, es que existen más de 100 familias de sustancias activas con diferentes propiedades físicas y químicas. El desarrollo de un método analítico universal resulta una utopía y más si se tiene en cuenta que muchas veces es necesario incluir en los análisis algunos metabolitos relevantes. Por ello, cuando se pretende monitorizar la presencia de gran número de compuestos se aplican métodos multirresiduales, que pueden incluir a varios plaguicidas de diferentes familias. Aunque cada vez estos métodos incluyen más plaguicidas (actualmente, se pueden encontrar algunos métodos reportados capaces de determinar del orden de 200-300 compuestos), también son necesarios métodos individuales, ya sea por motivos legales, porque la reglamentación obliga a aplicar un método específico para el compuesto y/o sus metabolitos, o por

motivos derivados de la naturaleza del compuesto, porque éste se degrada fácilmente, porque no puede separarse fácilmente de la matriz, o incluso porque no puede determinarse adecuadamente en las condiciones generales de medida establecidas, motivos por los cuales no puede incluirse en métodos multirresiduales y se requieren tratamientos especiales y/o específicos.

Los compuestos problemáticos, desde el punto de vista analítico, son aquellos que durante alguna de las etapas del análisis se degradan o se pierden, de modo que su determinación resulta complicada. Algunos de los plaguicidas conocidos por ser problemáticos en cuanto a su determinación a nivel de residuos son folpet, captan, clorotalonil, piretrinas y piretroides, y ditiocarbamatos como tiram, mancozeb o metam sodio, entre otros (Blasco, 2004; Lehotay, 2005a; Lehotay, 2005b; Lehotay, 2010; Mastovska, 2004). Cuando se trabaja en el ámbito de residuos de plaguicidas, las bajas concentraciones intensifican esta problemática, y además, resulta difícil determinar la etapa en la que se produce la degradación o pérdida, ya que puede ocurrir durante el procesado, extracción, *clean-up*, inyección, separación o detección (Lehotay, 2005a). Los factores que pueden ocasionar estas pérdidas pueden tener distinto origen (Mitra, 2003):

- *Físicos*: Pueden producirse pérdidas por volatilización, difusión y/o adsorción.
- *Químicos*: Se deben a reacciones fotoquímicas, de hidrólisis, o de oxidación, entre otros.
- *Biológicos*: Producidos por reacciones enzimáticas y biodegradación.

Aunque resulta complicado controlar estos factores, se pueden utilizar algunas estrategias que pueden prevenir las pérdidas, como el control del pH, temperatura, contenido de agua en la muestra, intensidad de la luz, la elección del disolvente orgánico, adición de conservantes, etc.

Los analitos incluidos en el desarrollo de esta Tesis son considerados problemáticos, y por ello se han considerado de forma cuidadosa los factores que pueden causar la degradación/pérdida a fin de prevenirlos y paliar su efecto.

En general, un procedimiento para la determinación de residuos de plaguicidas consta de una etapa de toma de muestra, fuera del laboratorio, y otra de análisis en el laboratorio, que incluye las etapas generales de preparación de muestra, determinación cromatográfica y cuantificación de los analitos, y elaboración de un informe con los resultados. Las propiedades de los analitos (características y número) y el tipo de matriz (alimentos, suelos, aguas,...) en combinación con la técnica cromatográfica y el sistema de detección utilizados determinan en gran medida las distintas etapas requeridas en el análisis.

La preparación de muestra comienza tras la recepción de la muestra bruta en el laboratorio. Su objetivo es preparar la muestra para los análisis (por ejemplo, homogenización previa, secado, etc) y el posterior aislamiento de los analitos, tratando de eliminar componentes de la matriz que pueden interferir en la determinación. También se pretende, en la medida de lo posible, aumentar la concentración de los mismos en la muestra (extracto) mediante etapas de pre-concentración. En general, la preparación de muestra puede incluir procedimientos de trituración/homogenización, extracción y purificación/concentración.

Existen diversas técnicas de extracción en función de si la muestra es líquida (agua, aceite, zumo,...), sólida (suelo, vegetales,...) o gaseosa (aire, humos). En el caso de muestras líquidas, las técnicas de extracción más frecuentes son extracción líquido-líquido (LLE), extracción en fase sólida (SPE) y microextracción en fase sólida (SPME). Para muestras sólidas, la extracción con un disolvente orgánico es la más común. Generalmente, requiere la aplicación de energía para favorecer la difusión de los compuestos orgánicos desde la matriz hacia el disolvente. Entre los sistemas más comunes, además de la agitación con disolvente, se encuentran la extracción asistida con microondas (MAE), la extracción/trituración (ej. Ultraturrax), la extracción mediante ultrasonidos y la extracción con fluido presurizado (PFE).

Las técnicas de extracción aplicadas en la presente Tesis han sido la microextracción en fase sólida (SPME) y la extracción con disolventes orgánicos por agitación mecánica con trituración (Ultraturrax).

I. SPME

La microextracción en fase sólida (SPME) fue desarrollada en 1989 por Pawliszyn (Belardi, 1989). Debido a su particular diseño, presenta dos características diferenciadoras e interesantes: está libre de disolventes orgánicos y transfiere todo el analito extraído al sistema cromatográfico. Consiste en un soporte sólido recubierto de una pequeña cantidad de fase estacionaria que se expone a la muestra durante un periodo de tiempo definido para, posteriormente, realizar la desorción de los analitos retenidos directamente en el sistema cromatográfico. El avance de esta técnica fue rápido gracias al desarrollo de los primeros dispositivos en 1990 (Arthur, 1990). Posteriormente, en 1993, Supelco comercializó diversas fibras recubiertas junto con micro jeringas reutilizables que

sirven para alojar la fibra. Aunque, las primeras fibras disponibles comercialmente estaban recubiertas únicamente de polydimethylsiloxane (PDMS) y polyacrylate (PA), hoy en día existen diversos recubrimientos alternativos como Divinylbenzene/Carboxen/Polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) y Carbowax-Polyethylene Glycol (PEG), entre otros. La Figura 1.1 muestra el esquema de la micro jeringa comercializada por Supelco.

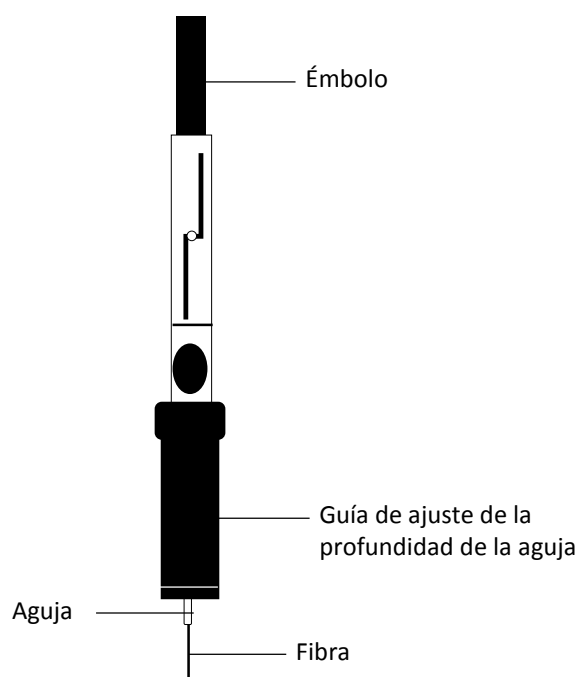


Figura 1.1. Primer diseño comercial de soporte y fibra de SPME de Supelco.

En cuanto al modo de aplicación, existen dos alternativas, la inmersión directa de la fibra en la muestra (DI), y la exposición de la fibra al espacio de cabeza (HS). La primera está indicada en el caso de muestras líquidas para la extracción de compuestos semi-volátiles; los analitos se transportan directamente de la

matriz a la fibra que se encuentra en contacto directo con la fase líquida. La segunda resulta más recomendable en el caso de compuestos volátiles y/o muestras de matriz compleja o muy sucias; en este caso, los analitos pasan de la muestra al aire del espacio de cabeza y posteriormente de éste a la fibra.

La técnica SPME se basa en el equilibrio entre la concentración de los analitos en la matriz y la fibra, en el caso de DI, o entre la concentración de los analitos en la matriz, el espacio de cabeza y la fibra, en el caso de HS. Una vez se alcanza el equilibrio, la cantidad de analito extraída es constante independientemente del tiempo. Ai (Ai, 1997) desarrolló las ecuaciones experimentales que permiten predecir la masa de analito extraído en función del tiempo:

$$n = n_o (1 - e^{-at})$$

Ecuación 1

Siendo n y n_o las masas de analito extraídas a tiempo t y en el equilibrio, respectivamente, y a un parámetro que indica la rapidez con la que se alcanza el equilibrio. Gracias a la existencia de esta relación matemática, es posible realizar aplicaciones cuantitativas sin trabajar en condiciones de equilibrio, con la estricta condición de que se mantengan fijas, y bien controladas, las condiciones y el tiempo de extracción. Uno de los puntos más delicados en el uso de SPME es la dificultad en la cuantificación, ya que al tratarse de una técnica no cuantitativa, es decir no se extrae todo el analito presente en la muestra, la cuantificación utilizando calibrado externo en solvente no es viable. Una alternativa puede ser someter a disoluciones patrón en medio acuoso al proceso SPME y cuantificar con el calibrado obtenido, pero las constantes de distribución del analito en las distintas fases dependen de la composición y polaridad de las disoluciones y/o de

las muestras, por lo que los resultados obtenidos pueden no ser satisfactorios, sobre todo en muestras complejas. En estos casos, en los que se observa efecto matriz, existen diversas maneras para cuantificar, como por ejemplo el uso de patrones internos, la calibración en matriz, etc. Una alternativa para mejorar la cuantificación es la aplicación de múltiple SPME (MSPME), cuyo objetivo es la estimación empírica de la respuesta total de analito, la cual está directamente relacionada con la masa total de analito presente en la muestra, realizando únicamente una extracción sobre la muestra y cuantificando con calibrado en solvente. Para ello, en primer lugar, se realizan sucesivas extracciones sobre la misma muestra, de manera que la respuesta del analito decae exponencialmente tras las extracciones, lo que permite obtener una ecuación matemática empírica que relaciona la respuesta obtenida tras una extracción con la respuesta total correspondiente al analito presente. El desarrollo matemático de las ecuaciones de este proceso conlleva a la ecuación (Tena, 2007):

$$A_T = A_1 / (1 - \beta)$$

Ecuación 2

Siendo A_1 el área obtenida tras la primera extracción y β un parámetro característico de cada analito, que equivale a la fracción de analito que queda en el sistema en el equilibrio. En condiciones de no equilibrio, β se sustituye por β' , que es la fracción de analito que queda en el sistema tras un determinado tiempo de extracción. De este modo, el área total, A_T , puede estimarse a partir únicamente del área obtenida tras la primera extracción, A_1 . Para ello, es necesario conocer el valor de β o β' , que se obtiene experimentalmente mediante el ajuste por regresión lineal de los logaritmos de las áreas individuales obtenidas tras las extracciones consecutivas según la ecuación:

$$\log A_i = (i-1) \log \beta + \log A_1$$

Ecuación 3

En la que A_i es el área obtenida en la extracción i . El valor de A_1 puede utilizarse para la cuantificación de los analitos utilizando un calibrado en solvente. Ahora bien, únicamente en los casos en los que el valor de β está comprendido entre 0.4 y 0.95 la cuantificación con calibración en solvente puede ser adecuada, ya que si el valor de β es inferior a 0.4 o superior a 0.95 la eficiencia de la extracción resulta demasiado alta o baja, respectivamente, y la cuantificación con disoluciones patrón puede no ser adecuada (Tena, 2007).

II. Extracción de muestras sólidas con disolvente orgánico

La extracción de muestras sólidas se realiza en la mayoría de aplicaciones, tal y como se ha indicado anteriormente, mediante el uso de disolvente y aplicación de algún modo de energía (mecánica, calorífica,...). Una de las variables, posiblemente la más importante, es la elección del disolvente orgánico, que se realiza en función de la combinación matriz/analito a estudiar junto con la técnica cromatográfica que va a ser aplicada. Los analitos deben ser solubles y estables en el disolvente seleccionado, de modo que pueda utilizarse para la extracción y/o las posibles etapas de purificación y, además, es recomendable que las propiedades fisicoquímicas sean adecuadas para que pueda ser inyectado directamente en el sistema cromatográfico sin necesidad de realizar un cambio de disolvente. Una revisión de la bibliografía existente indica que entre los disolventes más utilizados en el análisis de residuos de plaguicidas se encuentran acetonitrilo, acetona y acetato de etilo (Mastovska, 2004). El acetonitrilo es la base del método “universal” QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, effective, rugged and Safe) (Anastassiades, 2003a; Lehotay, 2005a; Lehotay, 2005b; Lehotay, 2007) que hoy

en día es ampliamente utilizado; la acetona resulta adecuada tanto para compuestos polares como apolares; y el acetato de etilo extrae eficazmente a los plaguicidas más apolares, aunque también extrae a las grasas y ceras presentes en la matriz. Otro de los aspectos/variables fundamentales en el proceso de extracción es el tipo de energía utilizada para favorecer la transferencia de los analitos. En este sentido, se suele utilizar Ultratúrrax (extracción/trituración), agitación mecánica, Vórtex o incluso ultrasonido, para asegurar la homogenización entre el disolvente y la muestra y aumentar su efectividad.

En el caso de muestras de matriz compleja, en muchas ocasiones es necesario realizar una etapa de purificación (*clean-up*), posterior a la extracción con disolventes orgánicos, para eliminar componentes de la matriz que pueden interferir y, de este modo, mejorar la detección de los analitos. Existen diversas técnicas de *clean-up*, entre las que cabe destacar la extracción en fase sólida (SPE), que es la que se ha utilizado en esta Tesis. Su aplicación más frecuente es como técnica de extracción en muestras líquidas, ejerciendo un doble papel de extracción y purificación. El formato comercial más común es en cartuchos rellenos con un adsorbente, cuyas características y polaridad son determinantes en la efectividad del proceso. Los principales tipos de adsorbentes son:

- *Adsorbentes hidrofóbicos*: Presentan grupos funcionales no polares que muestran mayor afinidad por compuestos de polaridad media y baja. El modo de trabajo es en fase inversa.
- *Adsorbentes hidrofílicos*: En este caso presentan grupos funcionales polares que permiten retener compuestos con grupos polares. El modo de trabajo es en fase normal.

- *Adsorbentes de intercambio iónico:* Se crea una fuerte atracción con los compuestos en forma iónica presentes en la muestra. Dependen del pH y existen diversas fases de intercambio tanto aniónico como catiónico.
- *Adsorbentes especiales*

Un procedimiento general de SPE consta de 5 etapas, que pueden verse representadas en la Figura 1.2:

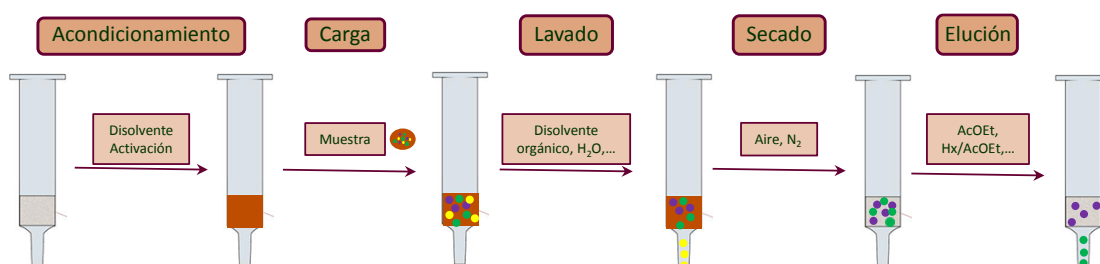


Figura 1.2. Esquema general de SPE

- *Etapas de acondicionamiento:* Se activa el adsorbente mediante el paso de un determinado volumen de disolvente o mezcla de disolventes.
- *Etapas de carga de muestra:* Se aplica la muestra en la parte superior del cartucho. El analito queda adsorbido así como los componentes de la matriz que tengan características similares.
- *Etapas de lavado:* Permite eliminar interferentes de la matriz manteniendo a los analitos retenidos en el adsorbente.
- *Etapas de secado:* Elimina el agua del cartucho, en el caso de la fase inversa.
- *Etapas de elución:* Se pasa un disolvente adecuado para eluir los compuestos de interés manteniendo retenidos a los interferentes.

1.3. ACOPLAMIENTO CROMATOGRAFÍA-ESPECTROMETRÍA DE MASAS

En las últimas décadas se ha producido una importante y constante evolución de las técnicas instrumentales con objeto de mejorar su potencial y aumentar la sensibilidad y selectividad de los métodos analíticos. Gracias a estos avances, el tratamiento y resolución de muestras complejas puede simplificarse en lo que respecta a las etapas de manipulación y preparación de muestra.

En este sentido, el acoplamiento cromatografía-espectrometría de masas es una herramienta muy poderosa en el análisis de residuos de plaguicidas, ya que combina el poder de separación de la cromatografía junto con la información estructural proporcionada por la espectrometría de masas, permitiendo la separación e identificación de muestras complejas.

1.3.1 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

I. Cromatografía de gases

La cromatografía de gases es la técnica preferida para la determinación de compuestos volátiles y semi-volátiles, térmicamente estables. La fase móvil es un gas que recorre el sistema desde el inyector a través la fase estacionaria hasta el detector, de modo que participa en el transporte de los analitos pero no interacciona con ellos. La fase estacionaria se encuentra en el interior de una columna, que a su vez se sitúa en el interior de un horno con estricto control de la temperatura. Hoy en día, las columnas más utilizadas, fabricadas en forma de tubo de sílice fundida, son abiertas y la fase estacionaria recubre la pared interna de las mismas. Los principales parámetros que controlan el proceso de separación son el

flujo del gas portador, el espesor y tipo de la fase estacionaria y la temperatura (o programa de temperaturas).

Las principales características a considerar en la elección de la fase estacionaria de la columna son la selectividad y la polaridad. La selectividad es la capacidad de la fase estacionaria para diferenciar las moléculas por sus propiedades físicas o químicas. Para las fases estacionarias líquidas o resinas (polisiloxanos y polietilenglicoles), las principales interacciones entre la fase estacionaria y los solutos que definen la selectividad son de dispersión, dipolar y puentes de hidrógeno. La polaridad depende de la estructura de la fase y afecta directamente a la separación de los picos cromatográficos, pero no está directamente relacionada con la selectividad. Para compuestos con similar volatilidad se obtiene mayor retención para aquellos con polaridad similar a la de la fase estacionaria. La polaridad también afecta a características de la columna como la durabilidad, rango de temperatura, sangrado y eficiencia. En general las columnas más apolares presentan mayor durabilidad y eficiencia, y permiten trabajar a temperaturas más altas que las columnas más polares (Agilent, 2007).

La introducción de las muestras en el sistema cromatográfico se realiza mediante el uso de un inyector, existiendo diversos sistemas de inyección en cromatografía de gases capilar:

- *Split/Splitless*: Es el inyector más común en cromatografía de gases capilar y permite dos modos de trabajo diferentes. La muestra se introduce en un tubo de evaporación (*liner*) a temperatura elevada, 200-300°C, con el propósito de evaporar la muestra y mezclar los analitos en fase vapor con el gas portador. En modo *split*, tras vaporizar la muestra se produce una

división del flujo, de manera que únicamente una fracción de la muestra se transfiere a la columna y la mayor parte se elimina junto con el gas portador a través de una válvula. En modo *splitless* se realiza la transferencia de la totalidad de la muestra vaporizada a la columna, la válvula de split permanece cerrada durante los primeros 30-60 s tras la inyección. En el caso de muestras que presenten gran concentración de analitos se recomienda el modo *split*, en cambio a niveles de trazas para mejorar los límites de detección se recomienda el modo *splitless* (Grob, 2004)

- *On-column*: La muestra líquida se introduce directamente en la columna donde se vaporiza según el programa de temperaturas del horno. En el caso de muestras sucias podría haber problemas de contaminación y ensanchamiento/deformación de los picos cromatográficos. Mediante el uso de pre-columnas sin fase, *retention gap*, podrían reducirse o controlarse estos problemas.
- *Vaporización de temperatura programable (PTV)*: Es similar en diseño y funcionamiento al inyector *split/splitless* pero permite una programación de la temperatura del inyector, trabajando habitualmente en una inyección a baja temperatura (próxima a la temperatura de ebullición del disolvente) para posteriormente aplicar un calentamiento balístico y transferir los analitos a la columna. La aplicación de un programa de temperatura mejora la transferencia al interior de la columna, evita degradación térmica de ciertos analitos en algunos casos, y además permite la inyección de grandes volúmenes de muestra (Grob, 2004).

II. Acoplamiento cromatografía de gases/espectrometría de masas

El acoplamiento de cromatografía de gases capilar a espectrometría de masas se realiza mediante la entrada directa del flujo saliente de la columna a la zona de la fuente de ionización del espectrómetro de masas, mediante una interfase que consiste únicamente en una línea de transferencia caliente. Las fuentes de ionización, responsables de generar los iones característicos de los analitos, utilizadas en los trabajos desarrollados en esta tesis han sido ionización electrónica (EI) e ionización química (CI), y ambas operan en condiciones de alto vacío.

- La *ionización electrónica (EI)* es la técnica de ionización más utilizada. Las moléculas son bombardeadas por un haz de electrones emitidos por un filamento, normalmente con una energía de 70 eV. La interacción entre las moléculas del analito y los electrones emitidos provoca una transferencia de energía desde el electrón a la molécula, causando la expulsión de uno de los electrones de la molécula. Cuanto mayor sea la transferencia de energía desde el electrón a la molécula, mayor será la tendencia del ion molecular generado a fragmentarse. El espectro obtenido es una huella dactilar del compuesto, lo que permite su comparación con una librería de espectros y, a su vez, facilita la identificación del compuesto. Los filamentos utilizados en EI trabajan a temperaturas mayores a 150°C, normalmente el recinto de la fuente de ionización se mantiene a una temperatura entre 200-300°C para evitar la condensación de los analitos y la posible acumulación de restos en las paredes de la fuente.

- La *ionización química (CI)*, cuyo principal interés radica en que es una técnica de ionización más suave que la EI, requiere de la introducción de un gas reactivo (metano, isobutano,...) en la fuente de ionización que interacciona con los electrones emitidos por el filamento y se ioniza. Cuando el gas ionizado reacciona con las moléculas del analito, se generan iones producto positivos y estables. A este proceso se le denomina ionización química positiva (PCI). Por otro lado, el gas reactivo disminuye la energía de los electrones emitidos por el filamento (electrones térmicos), propiciando que éstos puedan ser capturados por moléculas con grupos altamente electronegativos. A este proceso se le denomina ionización química negativa (NCI), o *electron capture negative ionization* (ECNI). La transferencia de energía desde las moléculas de gas ionizado o desde los electrones térmicos a las moléculas del analito no suele ser muy elevada, por lo que la fragmentación es menor e incluso puede ser inexistente, de modo que suele obtenerse el ion molecular del analito. La Figura 1.3 muestra un esquema de la ionización de una molécula en modo de ionización química en positivo y negativo.

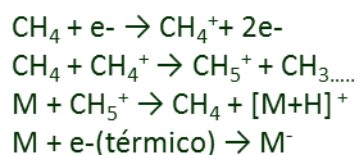


Figura 1.3. Esquema general de CI

En general, la ionización electrónica presenta una mejor reproducibilidad que la ionización química, debido a que el gas reactivo que se introduce en la fuente de ionización química necesita cierta presión óptima para lograr una

elevada cantidad de iones reactivos, y así evitar que las moléculas del analito se ionicen por la ionización electrónica. Por otro lado, cabe destacar la mejora en cuanto a sensibilidad que se obtiene en la fuente de ionización química para determinados compuestos, como por ejemplo aquellos que presentan algún halógeno en su estructura en modo NCI.

1.3.2 Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

I. Cromatografía líquida

La cromatografía líquida puede ser aplicada a gran variedad de compuestos químicos, incluyendo aquellos que presentan baja estabilidad térmica, elevada polaridad e incluso especies iónicas. La fase móvil es un líquido, normalmente una mezcla de disolventes de diferente polaridad, que fluye a través de la fase estacionaria contenida en una columna cerrada. La separación se produce como resultado de la interacción de los analitos con ambas fases, lo que provoca que se muevan a distinta velocidad por el sistema. Para mejorar la eficacia de la separación, en los últimos años se ha reducido el tamaño de partícula de la fase estacionaria hasta pocas micras, lo que a su vez, ha obligado a utilizar sistemas capaces de soportar altas presiones, para hacer fluir la fase móvil a través de la columna. Así, dependiendo del tamaño de partícula se puede considerar la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), con partículas mayores de 2 μm , o la cromatografía líquida de ultra resolución (o presión) (UHPLC), con partículas menores de 2 μm .

En función de las características de la fase estacionaria, y de los mecanismos de retención, la cromatografía líquida se clasifica en cromatografía de partición,

de adsorción, de intercambio iónico, de exclusión y de afinidad. Al mismo tiempo, la fase móvil interacciona con los analitos mediante distintos tipos de mecanismos, como interacciones iónicas, por puentes de hidrógeno, dipolares y fuerzas de van der Waals. La discusión teórica de cada uno de estos mecanismos queda fuera de los objetivos de esta Tesis, y puede ser consultada en la bibliografía especializada (Ardrey, 2003; Snyder, 2009; Poole, 2003).

La relación de polaridad entre la fase estacionaria y la fase móvil permite otra clasificación de la cromatografía líquida en dos tipos: cromatografía en fase normal y cromatografía en fase inversa (o reversa). En fase normal la fase estacionaria es polar (grupos ciano, amino o sílica, entre otros) y la fase móvil apolar (éter etílico, hexano, diclorometano, cloroformo); en cambio, en fase inversa la fase estacionaria es apolar (largas cadenas hidrocarbonadas, por ejemplo compuestas por 18 átomos de carbono) y la fase móvil polar (agua, acetonitrilo o metanol). En los trabajos incluidos en el capítulo 4 de esta Tesis, se ha aplicado la cromatografía líquida en fase inversa.

II. *Acoplamiento cromatografía líquida/espectrometría de masas*

El desarrollo del acoplamiento cromatografía líquida/espectrometría de masas fue más tardío que en el caso de la cromatografía de gases, debido principalmente a tres inconvenientes: 1) incompatibilidad entre la fase móvil líquida y el alto vacío requerido en el espectrómetro de masas; 2) incompatibilidad de la composición de la fase móvil, en el caso de aquellas que presenten aditivos no-volátiles como sales formadoras de pares iónicos; 3) incompatibilidad con las propiedades del analito, en el caso de compuestos termolábiles o no-volátiles. Las primeras interfases que se desarrollaron en las décadas de 1970-1980 afrontaban

la eliminación del solvente previa a la entrada en el espectrómetro de masas, mediante sistemas de transporte (*moving belt interface*) o separadores moleculares (*particle beam interface*) (McFadden, 1976; Scott, 1974; Willoughby, 1984). Durante la década de 1980 se introdujo la interfase *thermospray*, que permitía trabajar con flujos más altos y determinar compuestos termolábiles, pero su aplicación quedó limitada debido a que las condiciones de trabajo óptimas dependían en exceso del tipo de muestra a analizar (Blakley, 1983). La aparición en la década de 1980 de las interfases a presión atmosférica (API) y su posterior implementación en la década de 1990, permitieron solventar los problemas de incompatibilidad líquido/alto vacío gracias a la formación de los iones a presión atmosférica fuera de la zona de alto vacío. Hoy en día, este tipo de interfases son las más utilizadas en LC-MS, en concreto la de electrospray (ESI) y la de ionización química (APCI). Su desarrollo ha sido determinante en el avance tecnológico de la técnica LC-MS y en su aplicación a numerosos ámbitos de trabajo. De hecho, en el año 2002 John F. Fenn fue galardonado con el premio Nobel de Química por su contribución al desarrollo de la interfase ESI, permitiendo su aplicación a la identificación y elucidación estructural de macromoléculas biológicas (Fenn, 1989).

- *Electrospray (ESI)* está basada en la aplicación de un voltaje elevado (3-6 kV), a presión atmosférica, al flujo de la fase móvil cuando pasa por un tubo capilar de acero inoxidable en la entrada del espectrómetro de masas. Las moléculas de analitos y de disolventes ya ionizados se dispersan y forman pequeñas gotas cargadas en un aerosol fino (nebulización). Las moléculas de disolvente se evaporan (desolvatación) y las gotas del aerosol cada vez se hacen más pequeñas y se van deformando por la repulsión

electrostática entre cargas iguales. Finalmente, cuando las fuerzas repulsivas superan a las fuerzas cohesivas de la tensión superficial, se produce la ruptura de la gota originando iones en fase gaseosa (explosión de Coulomb), que entran en el analizador a través de lentes focalizadoras.

- La *ionización química a presión atmosférica (APCI)* se basa en las reacciones químicas entre las moléculas de la fase móvil cargadas y los analitos. El flujo de la fase móvil se nebuliza en un tubo de sílice fundida caliente donde el disolvente se evapora casi por completo. Una vez entra en la fuente se produce la ionización del disolvente gracias a una aguja que genera electrones. Las reacciones entre las moléculas ionizadas del disolvente y los analitos suceden en fase gas, y pueden dar lugar a moléculas de analito protonadas, desprotonadas y aductos con las moléculas de la fase móvil o con algún modificador añadido.

La principal diferencia entre las interfases ESI y APCI se halla en la fase en que se realiza la ionización. En ESI, las moléculas están en disolución y en APCI en fase gas. Por este motivo, APCI no es adecuada en el caso de compuestos de baja volatilidad y termolábiles siendo, en estos casos, más recomendable la interfase ESI. Respecto a los flujos de trabajo, en ESI se trabaja con flujos del orden de $\mu\text{L}/\text{min}$ mientras que en APCI se obtiene un rendimiento mayor a flujos del orden de mL/min .

Por otro lado, en el caso de ESI, la ionización de moléculas grandes con varias posiciones ionizables permite la generación de iones policargados, gracias a la acumulación de la carga en las gotas junto con las modificaciones de la carga producidas por el proceso electroquímico que puede ocurrir en el extremo del

capilar, debidos, por ejemplo, al pH de la fase móvil. La principal ventaja que presenta la obtención de estos iones, es la posibilidad de determinar moléculas de elevado peso molecular en analizadores con un reducido rango de masas. En el caso de APCI, generalmente se obtienen iones monocargados y por ello encuentra su mayor campo de aplicación en moléculas de baja o moderada masa molecular (Hoffmann, 2002).

La formación de aductos de las moléculas del analito con sodio, amonio o acetato, en modo de ionización positivo, o con formiato o acetato, en modo de ionización negativo, es común en estas interfases. Generalmente, los aductos suelen ser descartados en métodos MS/MS por la pobre fragmentación y reproducibilidad, por ello se suele maximizar la señal del ion molecular (molécula protonada o desprotonada) mediante la adición de modificadores ácidos, básicos o sales volátiles en bajas concentraciones. Ahora bien, en el caso de moléculas difíciles de ionizar, la formación de aductos puede ser una buena solución (Grimalt, 2005).

Respecto a la sensibilidad, la generación de iones en moléculas de polaridad media-alta parece ser mayor en la interfase ESI, mientras que para moléculas menos polares la formación de iones se ve más favorecida en la interfase APCI (Thurman, 2001). De ahí que ESI suela ser la interfase más utilizada en la determinación de compuestos polares en todo tipo de muestras.

1.3.3 Analizadores de espectrometría de masas. Cuadrupolo y triple cuadrupolo

El analizador es la parte del espectrómetro de masas que permite separar los iones que se han generado en la fuente de ionización en base a su relación masa/carga (m/z). La aplicación de diferentes campos eléctricos y magnéticos provoca alteraciones en la trayectoria y velocidad de los iones que lo atraviesan. Las principales características del analizador son: el rango de masas de trabajo, que en general hace referencia únicamente a la mayor relación m/z que puede ser medida; la transmisión de los iones, que es la relación entre los iones que llegan al detector y los que se generaron en la fuente; y la resolución, que es la habilidad para diferenciar entre dos iones que tienen una pequeña diferencia de masa (Hoffmann, 2002).

Existen diferentes tipos de analizadores de espectrometría de masas, entre los que destacan por su relevancia el cuadrupolo (Q), la trampa de iones (IT, LIT), el analizador de tiempo de vuelo (TOF), el sector magnético y la resonancia ciclotrónica con transformada de Fourier (FTMS).

En la presente Tesis se ha utilizado el cuadrupolo, tanto en configuración simple como en la configuración de triple cuadrupolo, por lo que este apartado se centra únicamente en estos dos analizadores.

I. Cuadrupolo simple (Q)

El cuadrupolo consiste en cuatro barras paralelas de sección circular o hiperbólica, equidistantes de un eje central imaginario (z). Sobre cada pareja de barras opuestas se aplican voltajes variables de corriente continua (DCI) y de radiofrecuencia (RF), de modo que los iones que viajan a lo largo del eje z están sometidos al campo eléctrico total y cambiante que resulta de la aplicación de distintos potenciales a las barras. Cuando los iones con determinada m/z

atraviesan el cuadrupolo, sufren aceleraciones a lo largo de los ejes x (horizontal) e y (vertical) perpendiculares a la trayectoria, z . La trayectoria para una determinada m/z se estabiliza si nunca alcanza las barras, llegando al detector. Los iones que no consiguen estabilizar la trayectoria, chocan contra las barras y no son detectados. De este modo, variando el voltaje aplicado pueden seleccionarse los iones que llegan al detector.

El cuadrupolo es un analizador de baja resolución, normalmente opera a resolución unidad pudiendo discernir iones cuyas m/z difieren 1 Da. Si se trata de aumentar la resolución, la sensibilidad se ve afectada negativamente debido a que cuando se estabilizan pocas trayectorias m/z menos iones llegan al detector, y aunque la diferenciación entre masas parecidas será más sencilla, la respuesta del detector disminuye notablemente.

Los modos de trabajo en un cuadrupolo son *full-scan* y *selected ion monitoring* (SIM):

- *Full-scan o barrido completo de iones* consiste en realizar un espectro de masas continuo en un rango definido.
- *SIM (selected ion monitoring)* es el modo de trabajo en el que se seleccionan determinados iones específicos de los analitos y, únicamente se miden estos.

La velocidad de barrido en el modo *full-scan* puede alcanzar las 20.000 $u/m/s$, pero su sensibilidad es baja y este efecto se acentúa al aumentar el rango de masas de medida. Sin embargo, en modo SIM la sensibilidad es mucho mayor, ya que en vez de medir un rango de masas se determinan únicamente unas m/z

seleccionadas, y el número de iones con misma m/z que alcanzan el detector es mayor.

II. Triple Cuadrupolo (QqQ)

La configuración de triple cuadrupolo consiste en el acoplamiento de dos cuadrupolos (Q_1 y Q_2) separados entre sí por un hexapolo u octapolo, llamado celda de colisión, dispuestos secuencialmente. La utilización de dos o más analizadores acoplados resulta muy ventajosa ya que permite trabajar en modo *tándem MS*.

La espectrometría de masas en *tándem* (MS/MS) aporta una nueva dimensión en cuanto al aislamiento, selectividad e información estructural de los analitos. Entre sus principales características cabe destacar el aumento de la sensibilidad y selectividad y la mejora de la relación señal/ruido, así como la eliminación de picos interferentes y su aplicabilidad a muestras complejas.

En el caso del QqQ, se introduce un gas inerte en la celda de colisión a una presión determinada que, junto con la aplicación de voltajes adecuados, causa colisiones con los iones procedentes del primer cuadrupolo, generándose los iones producto. Este proceso se conoce como disociación inducida por colisión (CID). Los iones producto generados se transfieren al segundo cuadrupolo y finalmente llegan al detector.

Según el modo de trabajo de cada cuadrupolo, existen diversos modos de trabajo en el QqQ:

- *Barrido de iones producto*, el primer cuadrupolo trabaja en modo SIM permitiendo el paso de una determinada m/z . Una vez ha transcurrido la fragmentación en la celda de colisión, todos los iones producto se transfieren al segundo cuadrupolo que trabaja en modo scan.
- *Búsqueda de iones precursores*, el primer cuadrupolo trabaja en modo scan mientras que el segundo cuadrupolo trabaja en modo SIM. Se obtiene un espectro de iones precursores que dan lugar a un mismo ion producto.
- *Búsqueda de pérdidas neutras (neutral loss, NL)*, ambos cuadrupolos trabajan en modo scan, y se trata identificar posibles pérdidas de fragmentos neutros que se han podido generar en la celda de colisión.
- *Selected Reaction Monitoring (SRM)*, ambos cuadrupolos trabajan en modo SIM. Se selecciona un ion precursor en el primer cuadrupolo y tras la fragmentación se selecciona un único ion producto en el segundo cuadrupolo.

El modo SRM es el más adecuado, y utilizado, para este tipo de analizador, ya que la sensibilidad y selectividad son muy elevadas y se alcanzan excelentes límites de detección (LOD). El principal inconveniente asociado a este modo de trabajo, es que la determinación o detección de compuestos se limita a aquellos preseleccionados, perdiendo la información espectral del resto de la muestra.

1.3.4 Efecto matiz

A pesar de los enormes avances realizados en la instrumentación analítica, siguen persistiendo problemas de cuantificación derivados de la complejidad de las muestras y que, generalmente, se engloban bajo la denominación de efecto matriz. El efecto matriz es la influencia, normalmente no deseada, de los componentes de la muestra distintos al analito en la señal analítica de éste. Este efecto puede traducirse en una exaltación o supresión de la respuesta del analito en la muestra respecto a su respuesta en solvente, y su intensidad depende de varios factores como la fuente de ionización o la interfase, las características físico-químicas del analito, la matriz de la muestra y los interferentes que co-eluyen con el analito.

En el caso de cromatografía de gases, el efecto matriz más común es la exaltación en la respuesta de los analitos, debido a que los componentes de la matriz ocupan las superficies activas del GC (inyector, columna y detector), dejando menos lugares disponibles para la interacción con los analitos y con ello favoreciendo la eficiencia en la transferencia de los mismos al detector. De este modo, se minimizan las pérdidas de los analitos en el GC y se mejoran las formas de los picos cromatográficos. Por ello, este efecto se considera una ventaja y para asegurar la correcta cuantificación de los analitos se prefiere corregirlo a eliminarlo (Anastassiades, 2003b; Kwon, 2012).

En cromatografía líquida, el efecto matriz no se debe a la cromatografía sino, generalmente, al proceso de ionización de los analitos en la interfase del espectrómetro de masas. Los componentes de la matriz que co-eluyen con los analitos y se ionizan en el mismo modo (positivo o negativo), interfieren durante la ionización bien compitiendo en el proceso (supresión de la señal), o bien favoreciendo la ionización (exaltación). Si

se mejora la cromatografía para evitar la co-elución o se cambia el modo de ionización, este efecto puede ser eliminado o, al menos, reducido (Niessen, 2006).

Cuando existe efecto matriz, la cuantificación de los analitos resulta problemática y pueden reportarse datos de concentraciones erróneos si se utilizan disoluciones patrón en solvente para la cuantificación. Para tratar de corregirlo, minimizarlo o eliminarlo existen diversas estrategias:

I. Patrón interno

La utilización de patrones internos marcados isotópicamente es una de las estrategias más frecuentes y eficientes para compensar el efecto matriz. Resulta muy adecuada en el caso de disponer de patrones marcados que se comporten de forma idéntica a los analitos durante el tratamiento de muestra, cromatografía e ionización. El principal inconveniente es que sólo están disponibles un número limitado de patrones marcados y suelen ser muy caros.

II. Calibrado en matriz

La calibración en matriz es la forma más común de compensar el efecto matriz en el ámbito de la determinación de plaguicidas en alimentos. La curva de calibrado se prepara a partir de extracto de muestra blanco con la finalidad de introducir la misma cantidad de matriz que en los extractos de las muestras analizadas. Este procedimiento es simple y económico, pero presenta el inconveniente de que se necesita suficiente cantidad de muestra blanco, lo más parecida posible a las muestras reales, e implica trabajo extra para preparar el extracto blanco que se utilizará para preparar el calibrado. Además, en ciertos campos de aplicación (por ejemplo, muestras de suelos o aguas), es muy difícil, si

no imposible, encontrar muestras blancas representativas y semejantes a las muestras analizadas, pues cada agua y suelo suele ser diferente en su composición, por lo que pueden verse afectados por efecto matriz diferentes.

III. Dilución

La dilución de los extractos con un solvente adecuado reduce la cantidad de matriz que se introduce en el sistema y, con ello, puede reducir o eliminar el efecto matriz. Ahora bien, generalmente causa un incremento en los límites de detección y sólo suele ser una aproximación adecuada cuando la sensibilidad del método/instrumento es alta y/o los niveles de concentración de los analitos son elevados.

IV. Adiciones estándar

Las adiciones estándar consisten en añadir cantidades crecientes del analito a una cantidad fija de la muestra, igualando así completamente patrones y muestra. Aunque es un método eficaz para corregir el efecto matriz requiere mucho trabajo y tiempo extra y, además, es necesario tener previamente una idea estimada de la concentración del analito en la muestra, con objeto de ajustar las adiciones correctamente.

V. Clean-up

Mejorar el tratamiento de muestra incluyendo etapas de purificación, puede ayudar a eliminar los interferentes que causan el efecto matriz antes de su introducción en el sistema cromatográfico. Puede resultar costoso y laborioso, pero resulta efectivo, y el hecho de introducir extractos '*más limpios*' permite

reducir el mantenimiento en los equipos instrumentales y mejorar los LODs al aumentar la relación señal/ruido.

VI. *Protectores de los analitos*

Los protectores de los analitos (AP) se utilizan en GC y se añaden tanto a los extractos de las muestras como a las disoluciones patrón. Con ello, se persigue que sean estos protectores los que ocupen los sitios activos del sistema cromatográfico y se produzca la misma exaltación en presencia o ausencia de la matriz. En general, se utilizan mezclas de AP seleccionados para cubrir un amplio rango de volatilidad, y así minimizar el efecto matriz y mejorar la robustez (Anastassiades, 2003b).

CAPITULO 2

ACOPLAMIENTO GC-MS

CAPITULO 2.1

**DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE PIRETROIDES EN
MUESTRAS VEGETALES MEDIANTE MICROEXTRACCIÓN
EN FASE SÓLIDA SEGUIDA DE GC-MS**

2.1.1. INTRODUCCIÓN

Las piretrinas son insecticidas naturales que se extraen de las flores de la familia del crisantemo y se han utilizado desde la antigüedad para combatir plagas. Su efectividad es muy buena pero presentan baja estabilidad, por lo que su aplicación debe ser frecuente con el consiguiente aumento del coste. Durante las décadas de 1940 y 1950, los compuestos organoclorados (OC) y organofosforados (OP) se presentaron como una alternativa más económica, pero debido a su elevada toxicidad y persistencia en el medio ambiente, muchos de ellos fueron prohibidos en la década de 1970. La necesidad de obtener nuevos insecticidas menos perjudiciales para los seres vivos y para el medio ambiente que los compuestos OC y OP, llevó al desarrollo de los piretroides, que son compuestos sintéticos con modificaciones estructurales de las piretrinas que mejoran su eficacia y estabilidad en el medio ambiente, aunque resultan más tóxicos para los mamíferos. Hoy en día, constituyen una de las principales familias de insecticidas utilizados para eliminar las plagas de insectos en agricultura, ya que pueden ser aplicados tanto en el campo como durante el almacenamiento de los cultivos. Su uso también se extiende al ámbito doméstico, veterinario y jardinería. La toxicidad de los piretroides depende de diversos factores como la dosis, la duración y la vía de contacto. Aunque algunos efectos en humanos todavía no están claros, los piretroides han sido incluidos como sospechosos de ser disruptores endocrinos y algunos de ellos (cipermetrin, permetrin y bifentrin) como posibles agentes cancerígenos (Feo, 2010).

La determinación de piretroides puede realizarse tanto por cromatografía de gases (GC) como por cromatografía líquida (LC) (Agüera, 2002; Alder, 2006; Bolaños, 2007; Chen, 2007; Fernandez-Alvarez, 2008; Gamón, 2001; Gil-García, 2006; Lentza-Rizos, 2001; Martínez, 2006; Parrilla, 2005). Respecto a los métodos basados en GC, al

ser compuestos que poseen uno o más halógenos en su estructura, la determinación mediante GC-ECD ha sido tradicionalmente reportada por su elevada sensibilidad (Chen, 2011; Jardim, 2014; Matsadiq, 2011; Yaohai, 2014). Sin embargo, hoy en día, el acoplamiento GC-MS/MS resulta el más adecuado por su elevada selectividad y especialmente por su alto potencial identificativo. (Cervera, 2010; Feo, 2011; Fernandes, 2012a; Fernandes, 2012b; Hernandez, 2013; Wong, 2010).

El principal inconveniente de los métodos basados en GC es la necesidad de realizar complejos tratamientos de muestra en comparación con los métodos basados en LC, ya que, en general, tras una etapa de extracción debe realizarse una purificación o concentración del extracto previa a la inyección en el sistema cromatográfico. En este sentido, la aplicación de la técnica SPME aporta grandes ventajas, puesto que es un proceso rápido y sencillo con gran capacidad de concentración de los analitos sin la necesidad de utilizar ningún disolvente orgánico (Beltran, 2000; Guillet, 2009). La mayor limitación en su aplicación en muestras complejas radica en la cuantificación, ya que la utilización de curvas externas de calibrado en solvente no es adecuada y se requiere el uso de otras estrategias como calibración en matriz, adiciones estándar o la utilización de patrones internos, las cuales resultan más costosas y tediosas.

La determinación de compuestos semi-volátiles, como los piretroides, en el análisis de alimentos puede realizarse mediante SPME en la modalidad inmersión directa (DI), técnica descrita en el capítulo 1, que puede aplicarse directamente sobre muestras líquidas o sobre una suspensión de la muestra triturada en agua, en el caso de que sea sólida (De Jager, 2008; Silva, 2013). Generalmente, en muestras sólidas, debido a la gran cantidad de interferentes presentes que dificultan la transmisión del analito desde la matriz a la fibra, se prefiere aplicar la inmersión sobre el extracto acuoso u

orgánico de la muestra en lugar de la muestra triturada (Aguinaga, 2009; Beltran, 2000; Guillet, 2009; Hernandez, 2000; Rodrigues, 2005; Viñas, 2009; Zhang, 2012).

En este contexto, el objetivo del presente trabajo fue el desarrollo de un método basado en DI-SPME-GC-MS simple y rápido, que permitiera la determinación de los piretroides bifentrin, lambda-cihalotrin, permetrin, ciflutrin, cipermetrin, fenvalerato y tau-fluvalinato en muestras de tomate. Se evaluó tanto la inmersión directa de la fibra sobre un extracto orgánico de tomate, como sobre una suspensión acuosa de la muestra. En el año en que se desarrolló este trabajo (2003), el número de publicaciones que reportaban la determinación de residuos de plaguicidas en muestras vegetales mediante SPME era muy escaso (Chen, 1998; Chen, 2002; Volante, 2000; Wennrich, 2001), por lo que el método desarrollado en su día resultó novedoso y en la actualidad cuenta con más de 60 citas.

La legislación europea establece (Council Directive 90/642/EEC; Regulation (EC) No 396/2005) los límites máximos de residuos (LMR) para los piretroides en alimentos de origen agrícola y animal. Durante los últimos años los valores de estos LMR han ido variando, en algunas ocasiones disminuyendo y en otras aumentando, en función de los estudios realizados tanto de eficacia como de toxicidad y en estudios de campo sobre ensayos de residuos. El *artículo científico 1* que se presenta a continuación, muestra el desarrollo de un método analítico cuya sensibilidad permite su aplicabilidad, incluso varios años después, para la determinación de residuos piretroides en muestras de tomate en cumplimiento con la legislación vigente. Teniendo en cuenta la dificultad asociada a la cuantificación en SPME, y más aun tratándose del modo inmersión directa en muestras vegetales, el objetivo del presente trabajo se centró principalmente en

evaluar las posibilidades cualitativas y cuantitativas del método desarrollado a la hora de monitorizar la presencia de residuos de piretroides.

2.1.2. ARTÍCULO CIENTÍFICO 1

Application of solid-phase microextraction for the determination of pyrethroid residues in vegetable samples by GC-MS

J. Beltran, A. Peruga, E. Pitarch, F. J. López, F. Hernández

Analytical and Bioanalytical Chemistry (2003) 376: 502–511

Anal Bioanal Chem (2003) 376: 502–511
DOI 10.1007/s00216-003-1916-z

ORIGINAL PAPER

J. Beltran · A. Peruga · E. Pitarch · F. J. López
F. Hernández**Application of solid-phase microextraction for the determination of pyrethroid residues in vegetable samples by GC-MS**Received: 12 November 2002 / Accepted: 13 March 2003 / Published online: 15 May 2003
© Springer-Verlag 2003

Abstract A solid-phase microextraction (SPME) method has been developed for the determination of 7 pyrethroid insecticides (bifenthrin, lambda-cyhalothrin, permethrin, cyfluthrin, cypermethrin, fenvalerate, and tau-fluvalinate) in water, vegetable (tomato), and fruit (strawberry) samples, based on direct immersion mode and subsequent desorption into the injection port of a GC/MS. The SPME procedure showed linear behavior in the range tested (0.5–50 $\mu\text{g L}^{-1}$ in water and 0.01–0.1 mg kg^{-1} in tomato) with r^2 values ranging between 0.97 and 0.99. For water samples limits of detection ranged between 0.1 and 2 $\mu\text{g L}^{-1}$ with relative standard deviations lower than 20%. Detection limits for tomato samples were between 0.003 and 0.025 mg kg^{-1} with relative standard deviations around 25%. Finally, the SPME procedure has been applied to vegetable (tomato) and fruit (strawberry) samples obtained from an experimental plot treated with lambda-cyhalothrin, and in both cases the analyte was detected and quantified using a calibration curve prepared using blank matrix. SPME has been shown to be a simple extraction technique which has a number of advantages such as solvent-free extraction, simplicity, and compatibility with chromatographic analytical systems. Difficulties with the correct quantification in a complex matrix are also discussed.

Keywords SPME · Pyrethroids · Vegetable samples · GC/MS

Introduction

Pyrethroid pesticides comprise an important group of insecticides, widely used as domestic insecticides, because of their relatively low toxicity and high knockdown effect with insects, and are also applied in agriculture, because

of their short field life and other advantageous environmental properties. In recent years, investigations have been directed towards obtaining synthetic pyrethroids, which are cheaper and more advantageous than natural pyrethroids, and that are widely used to protect different groups of crops, especially fruits, in many countries. Nowadays, new pyrethroids are being registered in Spain for their extensive use in fruit and vegetables, such as strawberries, lettuce, or tomato.

Maximum limits of residues established by the Agricultural Ministry for the pyrethroid insecticides in tomato are 0.5 mg kg^{-1} for lambda-cyhalothrin, cypermethrin, fluvalinate, and permethrin, 0.2 mg kg^{-1} for bifenthrin, 0.05 mg kg^{-1} for cyfluthrin and 0.02 mg kg^{-1} for fenvalerate. Thus, multiresidue methods applied for the determination of pyrethroids in vegetable samples should be sensitive enough to achieve these quantification levels.

Pesticide residue analysis in vegetable samples is typically based on methods that include multiple steps: extraction, clean-up and, finally, determination by gas or liquid chromatography, in some cases after derivatization. General procedures for pyrethroid analysis in vegetables usually include homogenization of samples, extraction of the analytes with an organic solvent, and clean-up of the final organic extract by solid-phase extraction or gel permeation chromatography followed by gas chromatography with ECD or MSD [1, 2, 3, 4, 5]. An example of reduction in sample preparation is reported by Columé et al. [6] as a method based on extraction of lyophilized fruit samples with hexane and a continuous preconcentration–elution system for automated clean-up using a silica sorbent column. The authors reported satisfactory recoveries and relative standard deviations in the range of 0.02–0.1 mg kg^{-1} for 14 pyrethroids in fruits and vegetables.

In contrast to conventional techniques, SPME is a solvent-free extraction that minimizes sample preparation allowing the extraction and concentration steps to be focused into a single step. This technique, whose initial concepts were published in 1989 by Belardi and Pawliszyn [7], is based on absorption of analytes onto a polymeric-coated fused-silica fiber, usually housed in a modified sy-

J. Beltran (✉) · A. Peruga · E. Pitarch · F. J. López · F. Hernández
Analytical Chemistry, Experimental Sciences Dept.,
University Jaume I, P.O. Box 8029 AP, 12080 Castellón, Spain
e-mail: beltranj@exp.uji.es

Application of solid-phase microextraction for the determination of pyrethroid residues in vegetable samples by GC-MS

Analytical and Bioanalytical Chemistry (2003) 376: 502–511

J. Beltran, A. Peruga, E. Pitarch, F. J. López, F. Hernández

University Jaume I, Analytical Chemistry, Experimental Sciences Dept., P.O. Box 8029 AP, 12080 Castellón, Spain

Received: 12 November 2002 / Accepted: 13 March 2003 / Published online: 15 May 2003. DOI 10.1007/s00216-003-1916-z

e-mail: beltranj@exp.uji.es

Abstract

A solid-phase microextraction (SPME) method has been developed for the determination of 7 pyrethroid insecticides (bifenthrin, lambda-cyhalothrin, permethrin, cyfluthrin, cypermethrin, fenvalerate, and tau-fluvalinate) in water, vegetable (tomato), and fruit (strawberry) samples, based on direct immersion mode and subsequent desorption into the injection port of a GC/MS. The SPME procedure showed linear behavior in the range tested ($0.5\text{--}50\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ in water and $0.01\text{--}0.1\text{ mg kg}^{-1}$ in tomato) with r^2 values ranging between 0.97 and 0.99. For water samples limits of detection ranged between 0.1 and $2\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ with relative standard deviations lower than 20%. Detection limits for tomato samples were between 0.003 and 0.025 mg kg^{-1} with relative standard deviations around 25%. Finally, the SPME procedure has been applied to vegetable (tomato) and fruit (strawberry) samples obtained from an experimental plot treated with lambda-cyhalothrin, and in both cases the analyte was detected and

quantified using a calibration curve prepared using blank matrix. SPME has been shown to be a simple extraction technique which has a number of advantages such as solvent-free extraction, simplicity, and compatibility with chromatographic analytical systems. Difficulties with the correct quantification in a complex matrix are also discussed.

Keywords

SPME, Pyrethroids, Vegetable samples, GC/MS

Introduction

Pyrethroid pesticides comprise an important group of insecticides, widely used as domestic insecticides, because of their relatively low toxicity and high knockdown effect with insects, and are also applied in agriculture, because of their short field life and other advantageous environmental properties. In recent years, investigations have been directed towards obtaining synthetic pyrethroids, which are cheaper and more advantageous than natural pyrethroids, and that are widely used to protect different groups of crops, especially fruits, in many countries. Nowadays, new pyrethroids are being registered in Spain for their extensive use in fruit and vegetables, such as strawberries, lettuce, or tomato.

Maximum limits of residues established by the Agricultural Ministry for the pyrethroid insecticides in tomato are 0.5 mg kg⁻¹ for lambda-cyhalothrin, cypermethrin, fluvalinate, and permethrin, 0.2 mg kg⁻¹ for bifenthrin, 0.05 mg kg⁻¹ for cyfluthrin and 0.02 mg kg⁻¹ for fenvalerate. Thus, multiresidue methods applied for the determination of pyrethroids in vegetable samples should be sensitive enough to achieve these quantification levels.

Pesticide residue analysis in vegetable samples is typically based on methods that include multiple steps: extraction, clean-up and, finally, determination by gas or liquid chromatography, in some cases after derivatization. General procedures for pyrethroid analysis in vegetables usually include homogenization of samples, extraction of the analytes with an organic solvent, and clean-up of the final organic extract by solid-phase extraction or gel permeation chromatography followed by gas chromatography with ECD or MSD [1, 2, 3, 4, 5]. An example of reduction in sample preparation is reported by Colume et al. [6] as a method based on extraction of lyophilized fruit samples with

hexane and a continuous preconcentration–elution system for automated clean-up using a silica sorbent column. The authors reported satisfactory recoveries and relative standard deviations in the range of 0.02–0.1 mg kg⁻¹ for 14 pyrethroids in fruits and vegetables.

In contrast to conventional techniques, SPME is a solvent-free extraction that minimizes sample preparation allowing the extraction and concentration steps to be focused into a single step. This technique, whose initial concepts were published in 1989 by Belardi and Pawliszyn [7], is based on absorption of analytes onto a polymeric-coated fused-silica fiber, usually housed in a modified syringe. Due to its advantages over classic extraction methods, SPME has received increasing attention since its commercial introduction in the nearly 1990s [8]. SPME has been applied to the determination of several organic compounds especially in gas and liquid samples, but also in a few solid samples, in combination with both GC and HPLC determination. Two modes of application of SPME have been extensively reported [9]: direct immersion (DI-SPME) and headspace (HS-SPME) extraction. In the former, the fiber is directly immersed in the liquid sample or in a sample suspension and the analytes are transported from the sample matrix to the fiber coating. In headspace extraction mode, the analytes are extracted in a three-phase system: sample (liquid or solid), headspace, and fiber coating.

SPME has been successfully applied to the determination of pesticide residue analysis in water, soil, food, and biological samples as reported in recent reviews published by Beltran et al. [10] and Kataoka et al. [11]. Water samples are by far the most widely analyzed by this technique.

The number of applications of SPME to complex matrices such as biological fluids is still limited; the headspace mode is the most attractive approach in this field [12, 13,

14, 15, 16]. Analysis of other samples such as soil [17, 18, 19] or food commodities [11, 20, 21] is generally based on a solvent extraction of the analytes before application of SPME.

The low number of references about pesticide determination in food samples by SPME derives from the complexity of these matrices, which makes an extraction of the sample prior to determination by direct immersion SPME necessary in most of cases. This fact can be overcome if headspace SPME is applied, as described in several papers dealing with pesticide residue determinations in fruits [22, 23, 24] or in a large number of papers related to determination of volatile compounds in food commodities [25, 26, 27, 28].

Determination of non-volatile pesticides has received increasing attention in the recent years in order to solve some of the problems related with the application of DI-SPME in complex matrices. Although several papers deal with direct immersion of the SPME fiber into a slurry of fruit with water [21, 29], other authors describe the need for a previous extraction of pesticides and the subsequent application of DI-SPME over the separated aqueous extract [30, 31, 32, 33]. The use of microwave-assisted extraction allows one to increase the extraction efficiency of less polar pesticides using water as extractant [29, 34]. Once the aqueous extract is obtained, the presence of interfering substances can reduce the efficiency of SPME. This problem can be overcome by simply diluting the extract in order to simplify the matrix complexity [35, 36]. Still another problem, closely related with pesticide residue determination in fruits by SPME, is the difficulty of quantification; in most cases it is necessary to use calibration curves prepared using blank matrix, standard addition calibration, and internal standards [23].

The aim of this work is to develop a DI-SPME procedure for the determination of selected pyrethroid insecticides at the part-per-billion level, in fruit (strawberry) and vegetable (tomato) samples. Final determination has been carried out by GC/MS using a quadrupole system in the selected ion monitoring mode for maximum sensitivity. The developed procedure has been applied to the determination of lambda-cyhalothrin in strawberry and tomato samples collected from treated experimental fields.

Experimental

Chemicals

Stock solutions were prepared by dissolving 50 mg of analytical standards (Dr Erhenstorfer, Promochen, Wesel, Germany) in 100 mL acetone and were stored at -18°C . Working standard solutions of pesticide mixtures were prepared by volume dilution in acetone, hexane, or methanol, and were stored at 4°C . Due to its higher chromatographic response, concentration of bifenthrin in standard mixtures was 10 times lower than the rest of pyrethroids. Spiked water samples were prepared by adding an appropriate volume of methanol pesticide standard solution to the sample (maintaining a final methanol content of 1%).

Organic solvents (hexane, acetone, methanol, and acetonitrile) were of pesticide residue analysis quality (Scharlab, Barcelona, Spain). Sodium chloride of analytical grade (Scharlab, Barcelona, Spain) was purified by overnight heating at 300°C .

Instrumentation

SPME Equipment

The SPME device for manual extraction consisted of a holder assembly and several replaceable fibers, and was purchased from Supelco (Madrid, Spain). Five different fiber types were compared: poly(dimethylsiloxane) (PDMS, 100 μm), poly(dimethylsiloxane)/divinylbenzene Stable Flex (PDMS/DVB, 65 μm), Carboxen/PDMS (CAR/PDMS, 75 μm), Carbowax/divinylbenzene (CW/DVB, 65 μm), and polyacrylate (PA, 85 μm). The fibers were conditioned prior to their first use as recommended by the manufacturer by heating them in the injection port of the chromatographic system for 0.5–2 h at 250–300°C, depending on the fiber coating.

GC analysis

Chromatographic analyses were performed using an Agilent 6890 Series GC equipped with an split–splitless injection port, and mass spectrometric detector (Agilent 5973 N MSD). The GC was fitted with a 30 m \times 0.25 mm I.D., 0.25 μm HP-5MS (5% phenyl methyl siloxane) column (Hewlett–Packard). Injector temperature, initial oven program temperature, and MSD conditions were investigated under the study.

Other equipment

Clear glass vials (4 mL) were used to perform SPME under magnetic stirring using a Teflon bar (10 mm \times 6 mm o.d.) and a magnetic stirrer (Agimatic REV-E, Selecta, Valencia, Spain). An ultrasonic bath (Ultrasons Selecta, Valencia, Spain) was used for the extraction of pyrethroids from chopped tomato samples.

Analytical procedures

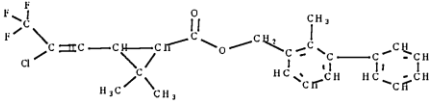
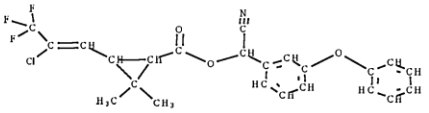
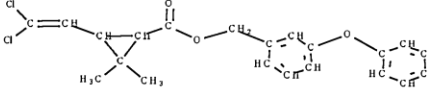
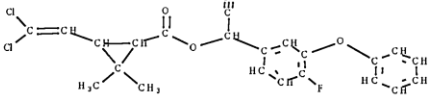
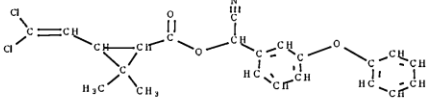
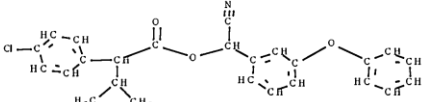
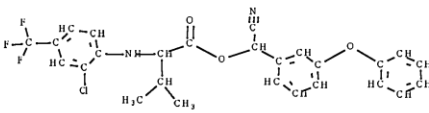
Extraction of water samples was carried out by direct immersion of the PDMS/DVB fiber into the sample (3 mL, 20% NaCl) contained in a 4 mL clear glass vial under magnetic stirring for 30 min at 40°C (120 rpm, reversing stirring direction every 20 s). The fiber was situated off-center in the vial so the sample flows perpendicular to the fiber axis. Desorption of pyrethroids was carried out at 270°C for 5 min in the hot split–splitless injector.

For the analysis of tomato or strawberry samples, 0.5 g of chopped sample, 2.5 mL of distilled water, 0.5 g of NaCl, and 200 μ L of hexane/acetone (1:1) were introduced in a 4 mL clear glass, and this mixture was shaken for 30 min in an ultrasonic bath. Pyrethroids were then extracted by direct dipping of the PDMS/ DVB fiber in the slurry as indicated before.

For the chromatographic determination, helium was used as carrier gas at a flow rate of 1 mL min⁻¹ (linear velocity \cong 37 cm s⁻¹). Injector temperature was 270°C and oven temperatures were programmed as follows: 90°C (5 min); then 30°C min⁻¹ to 265°C, and finally 4°C min⁻¹ to 300°C (hold time 4.42 min). Selected MSD conditions were: transfer line temperature 280°C, 50 eV electron impact, electron multiplier voltage 1800 V and mass range for full-scan experiments 100–230 *m/z*. Table 1 shows the list of analytes studied and the ions used for quantification by selected ion monitoring (SIM) mass detection.

Quantification of the samples was made using a calibration curve prepared by spiking blank chopped tomato or strawberry samples, and extracting these samples as indicated in the recommended procedure above.

Table 1 Physicochemical characteristics of compounds studied. Mass spectrum peaks used in SIM detection

Pyrethroid	Molecular Structure	Mw ^a	Log K _{ow} ^b	m/z
Bifenthrin		422.9	>6	<u>181</u> ^c , 166
Lambda - Cyhalothrin		449.9	7	<u>181</u> ^c , 141, 197, 208
Permethrin		391.3	6.1	<u>183</u> ^c , 163, 127
Cyfluthrin		434.3	6.0	<u>163</u> ^c , 127, 199, 206, 226
Cypermethrin		416.3	6.6	<u>163</u> ^c , 181, 209
Fenvalerate		419.9	5.01	<u>167</u> ^c , 125, 181, 225
Tau-Fluvalinate		502.9	4.26	<u>250</u> ^c , 181, 209

^aMw: Molecular weight

^bK_{ow}: Coefficient of distribution octanol-water.

^cUnderline: SIM ion used for quantitation.

Results and discussion

SPME optimization

Optimization of the SPME procedure was carried out in an early stage of the work by using three representative pyrethroids (lambda-cyhalothrin, fenvalerate, and cypermethrine) and then the optimum procedure was tested with the other compounds studied. Previous to the development of the procedure in vegetable samples, the SPME experimental parameters were optimized using spiked distilled water considering type of fiber, and absorption and desorption steps separately.

All experiments were carried out in duplicate, except for those related to precision studies where a minimum of six extractions were made.

Firstly, the choice of the fiber was carried out by fixing the absorption (30 min extraction of 3 mL of water spiked at $10\ \mu\text{g L}^{-1}$ level at ambient temperature) and desorption conditions (5 min desorption, 270°C injector temperature) and testing five different type of fibers (PDMS, PDMS/ DVB, PA, CX/PDMS, CW/DVB). The best results (Fig. 1) were obtained with the recently developed PDMS/DVB Stable Flex and, thus, this fiber was selected for further method development.

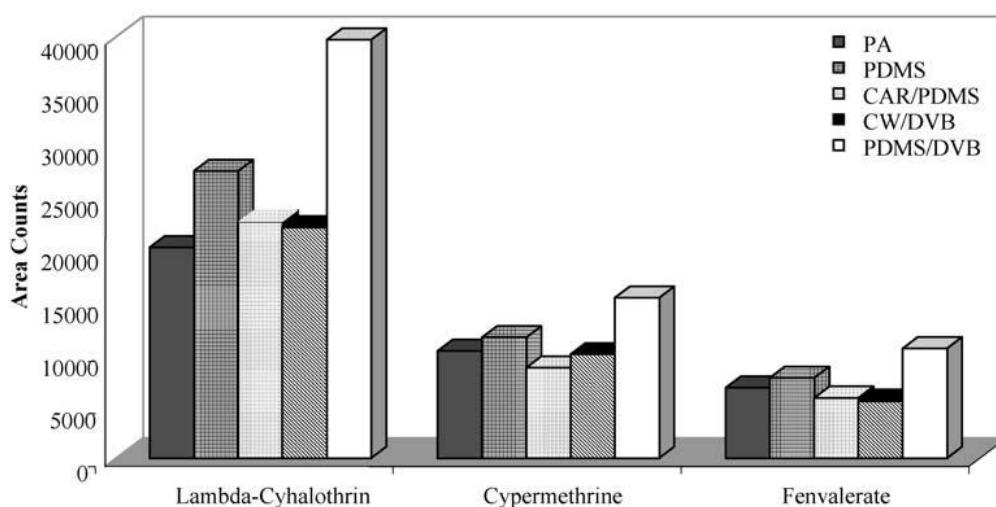


Fig. 1 Effect of SPME fiber type over extraction efficiency of selected pyrethroids (3 mL of $10 \mu\text{g L}^{-1}$ spiked water, 30 min extraction)

Optimum desorption conditions for desorption time, injector temperature, and depth of fiber into the injector glass-liner were then studied. Desorption temperatures assayed were 230, 250, and 270°C (selected according to the recommended temperature range indicated by the manufacturer), and although the results were very similar, 270°C was selected as it showed a slightly higher response together with lower carryover effect. The effect of the fiber depth into the liner was also checked, and the results showed that peak areas increased when the depth of the fiber into the injector glass-liner was higher (closer to the column entrance). The effect of desorption time was also investigated in the range of 1–10 min. Peak areas increased with longer desorption times, reaching complete desorption after 5 min which was then selected. Complete desorption was checked by studying carryover after 5 min desorption.

Optimization of the absorption step included several parameters. The first variable considered was ionic strength in order to use the salting-out effect that has been extensively used in liquid–liquid and solid-phase extraction. The effect of NaCl (or other

ionic salts) on SPME efficiency has been widely discussed and different behaviors reported [37, 38, 39, 40, 41]. In this paper, pyrethroids studied showed an increase in extraction efficiency with NaCl concentration. Thus, the addition of a 20% NaCl to the water sample produced a two-fold increase in extraction efficiency with respect to no salt addition.

The next step in the optimization of absorption was to study the effect of temperature on extraction efficiency. Temperatures tested were 25, 40, 60, and 90°C. Maximum peak areas were obtained at 40°C; these were very similar to those obtained at 60°C. At higher temperature (90°C) evaporation of sample was important, and losses of analytes seemed to take place.

As the magnetic stirrer used allowed one to control stirring speed as well as mode of stirring, allowing a cyclic change in stirring direction: the period and the speed of stirring were evaluated using stirring speeds of 0, 80, 120, and 140 rpm, and periods of 0, 20, 30, and 40 s. In the case of stirring speed, the responses increased notably from 0 to 120 rpm, but then at 140 rpm peak areas decreased again. The study of the stirring period showed no significant differences among the values, so 20 s was selected as the optimum value because the response was lightly higher. Thus, it could be concluded that, the best results were obtained at 120 rpm with a period of 20 s, which agrees with the fact that SPME is a technique based on equilibrium, and that good diffusion through the phases is essential to reach equilibrium faster.

Eisert and Pawliszyn [42] made a study comparing several agitation systems, and they concluded that there were in some cases, small differences even between the agitation systems tested.

Finally, the absorption equilibrium was studied by extracting replicate samples at different times, which were subsequently desorbed using the optimum conditions indicated above. Extraction times between 5 and 270 min, and volumes of 3 and 30 mL of water sample spiked at 10 ng g⁻¹ were checked. Analyte mass absorbed into the fiber as a function of extraction time was fitted to Eq. (1) given by Ai [43], who derived a time-dependent equation for analyte mass absorbed into the fiber coating, and which has already been tested in our laboratory [17]:

$$n = n_o (1 - e^{-at}) \quad (1)$$

where n and n_o are the amounts of analyte absorbed at a time t and at the equilibrium, respectively, and a is a parameter that measures how fast the absorption equilibrium can be reached in the SPME process.

Figure 2 shows the mass of analyte absorbed into the fiber from 3 or 30 mL of spiked water sample as a function of the extraction time. Experimental data were fitted to the Eq. (1) using MicroCal Origin software, obtaining the values of n_o , a , and equilibrium time (t_{eq} , estimated as the time necessary to extract 95% of n_o) (Table 2).

As can be seen, equilibrium time and parameter a were similar for all three pyrethroids. Increasing the sample volume up to 30 mL greatly increased the mass of analyte absorbed, but also equilibrium time and, accordingly, reduced extraction rates. Data obtained indicated that extracted amount at the equilibrium (n_o) was higher when compound polarity increased (see log K_{ow} values in Table 1), due to the relatively polar characteristics of the PDMS/ DVB fiber used.

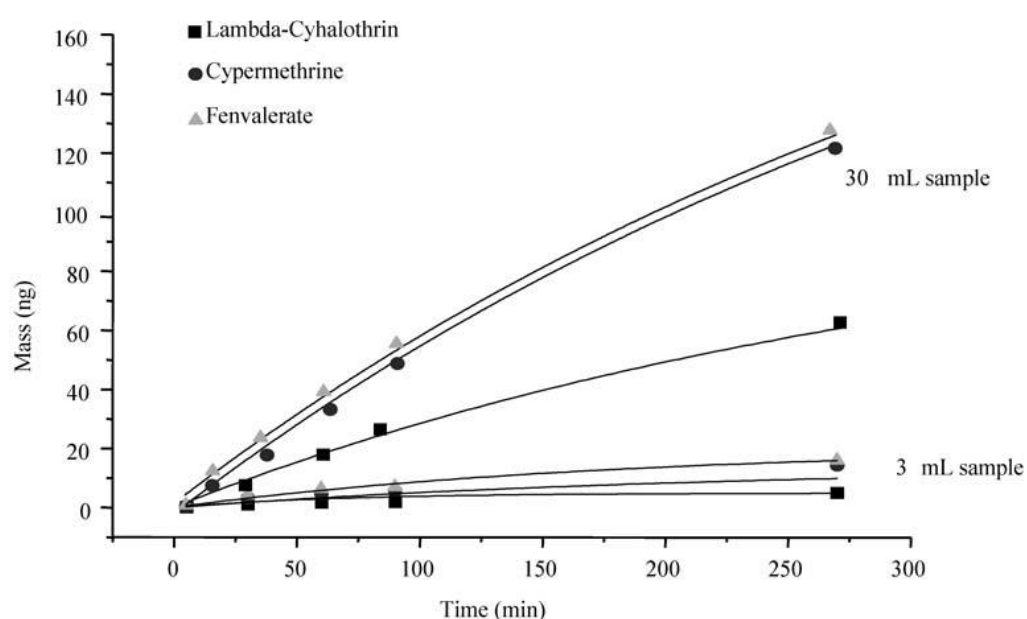


Fig. 2 SPME extraction times curves for selected pyrethroids at two sample volumes ($10 \mu\text{g L}^{-1}$ spiked water, PDMS/DVB fiber)

Table 2 Parameters resulting from mathematical fitting of absorbed amount versus extraction time for 3- and 30-mL sample volumes (spiked water samples at $10 \mu\text{g L}^{-1}$ level; PDMS/DVB fiber)

	3-mL sample volume			30-mL sample volume		
	n_o (ng)	a	t_{eq} (min)	n_o (ng)	a	t_{eq} (min)
Lambda-cyhalotrin	2.3	0.024	124	48	0.005	635
Cypermethrine	6.5	0.022	137	131	0.005	608
Fenvalerate	7.6	0.025	123	169	0.004	710

According to the fitted equations, establishing an extraction time of 30 min for the 3 mL sample should only limit the total amount absorbed by 50% with respect to the equilibrium situation, with an important reduction in analysis time and, consequently, an increase of sample throughput.

After optimization of all the variables considered, the recommended procedure was established as follows: extraction of 3 mL of water sample containing 20% NaCl under magnetic stirring for 30 min using a PDMS/DVB stable Flex fiber coating and subsequent desorption at 270°C over 5 min. In spite of lowering the analyte mass absorbed when using 3 mL of sample, the important reduction of equilibrium time and the good sensitivity for the overall analytical method justified the choice of small volumes of water samples, especially if the procedure has to be applied to extraction of vegetable samples.

The optimum procedure developed was applied to the extraction of seven pyrethroids in spiked water samples. The analytical characteristics of the recommended procedure were obtained, including linear dynamic range, precision, and detection limits. The linearity of the method was tested using a series of aqueous solutions (distilled water) in the concentration range 0.5–50 $\mu\text{g L}^{-1}$ (5 levels, two replicates for each level). After plotting the mean peak areas versus sample concentration to generate the calibration curves, a statistical regression model was applied to obtain the corresponding values for slope and intercept for each compound. The SPME procedure showed a linear behavior in the range tested with r^2 values ranging between 0.98 and 0.995. Precision of the method was obtained by analyzing six replicate water samples at three concentration levels (1, 10, and 50 $\mu\text{g L}^{-1}$). The RSD values obtained were below 20% in most cases, as can be seen in Table 3. Detection limits calculated for the chromatograms at the 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ level are also shown in Table 3, and varied between 0.1

and $2.0 \mu\text{g L}^{-1}$; similar data was reported by Barrionuevo and Lanças [44] who applied SPME method for pyrethroids in river water samples using PDMS fiber with detection limits at the sub $\mu\text{g L}^{-1}$ level.

Figure 3 shows a typical chromatogram for distilled water spiked at $10 \mu\text{g L}^{-1}$ and analyzed by the SPME procedure developed in this paper.

Table 3 Precision ($n=6$) and limit of detection of the recommended SPME procedure for the determination of pyrethroid residues in water samples

	RSD (%)			LOD
	$50 \mu\text{g L}^{-1}$	$10 \mu\text{g L}^{-1}$	$1 \mu\text{g L}^{-1}$	($\mu\text{g L}^{-1}$)
Bifenthrin	12	15	16	0.1
Lambda-cyhalotrin	20	18	23	1.0
Permethrin	13	18	25	0.1
Cyfluthrin	19	23	n.d	2.0^a
Cypermethrin	17	18	n.d	2.0^a
Fenvalerate	19	16	13	0.4
Tau-fluvalinate	27	24	24	0.2

^a Calculated from $10 \mu\text{g L}^{-1}$ level sample

n.d. not detected

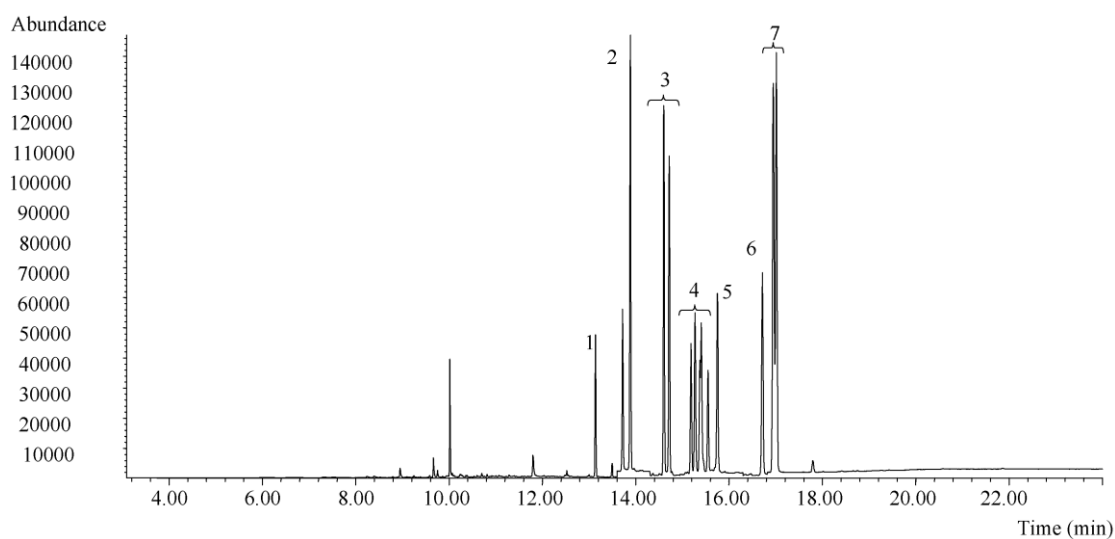


Fig. 3 GC-MS (TIC) chromatogram of a distilled water sample spiked at $10 \mu\text{g L}^{-1}$, and extracted by SPME. 1 Bifenthrin, 2 lambda-cyhalothrin, 3 permethrin, 4 cyfluthrin, 5 cypermethrin, 6 fenvalerate, and 7 tau-fluvalinate

Optimization of SPME applied to fruit and vegetable samples

Once the procedure for the determination of pyrethroids in water had been developed, the next step was to extend the application of SPME to fruit and vegetable samples (tomato and strawberry).

In a first approach, spiked tomato samples at the 0.1 mg kg^{-1} level were prepared by adding 0.2 mL of methanolic standard mixture of the pyrethroids to 10 g of triturated tomato; the mixture was shaken for 30 min aging for 10 h at 4°C and finally was extracted with acetone; this extract was dried over anhydrous Na_2SO_4 and concentrated to 10 mL. By following the same scheme previously developed and applied in a previous paper [17], the SPME procedure was applied to 0.5 mL of this extract, adding 2.5 mL of distilled water and 0.5 g of NaCl. The response was high, but carryover effects were extremely

persistent, even after desorbing the fiber in the injector port for six times; it was finally necessary to get rid of the fiber.

The experimental design was changed by considering the extraction of pyrethroids directly from an aqueous slurry of chopped tomato sample. This approach has already been applied by other authors for SPME extraction in different solid samples such as soils or fruits [33, 45]. Extraction of the samples was first performed by mixing 0.5 g of chopped spiked tomato with 2.5 mL of distilled water and 0.5 g of NaCl, and the mixture was submitted to an ultrasonic shaking for 30 min. SPME procedure was then applied by direct dipping of the fiber in the slurry using the optimized conditions described for aqueous samples. The results obtained were satisfactory, and all seven pyrethroids showed a good response in the GC-MS. Besides, once the fiber was desorbed for 5 min in the injection port, no carryover effect was observed.

In order to increase extraction efficiency, the effect of adding organic solvents to the sample was considered. The organic solvents tested were acetone, methanol, acetonitrile, hexane, and a mixture of acetone/hexane (1:1). In all experiments, the volume of organic solvent added to the slurry was 200 μ L. All the organic solvents used produced, in some degree, an increase in extraction efficiency with regards to the extraction without solvent, as can be seen in Fig.4, achieving the maximum extraction efficiency when adding 200 μ L of a mixture hexane/acetone (1:1). The mass of pyrethroids recovered after extraction under these conditions ranged between 0.190 and 0.900 ng (mass of pyrethroids added in each analyzed sample was 50 ng). When compared with the extraction without organic solvent, the increase in amount extracted was around 20 times, except for bifenthrin (4 times increase). Thus, the final recommended procedure used the addition of 200 μ L hexane/acetone (1:1) to the sample slurry (0.5 g tomato+2.5 mL distilled water containing 20% NaCl).

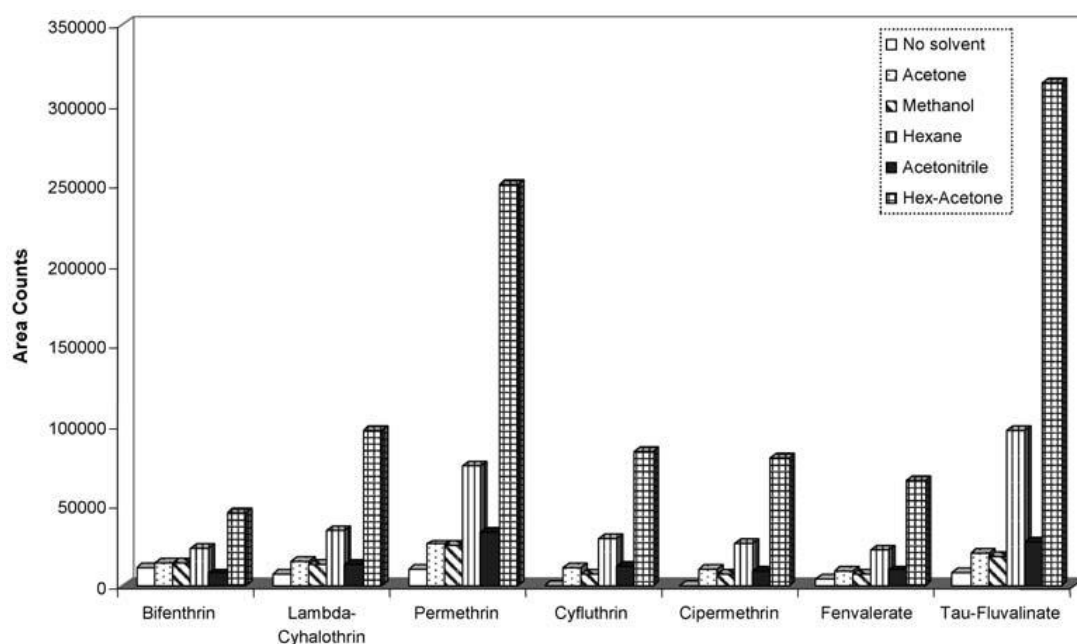


Fig. 4 Effect of addition of organic solvents (200 μ L) over the SPME extraction of pyrethroids in tomato samples (0.5 g tomato, 2.5 mL distilled water containing 20% NaCl)

Linearity of the method was determined by analyzing a calibration curve prepared in matrix, by spiking blank tomato samples with the methanolic standard mixture of the pyrethroids in five different levels ranging between 0.01 and 0.25 mg kg^{-1} (two replicates for each level were analyzed). The SPME procedure showed a linear behavior in the range tested with r^2 values ranging between 0.976 and 0.999.

Precision of the recommended procedure (Table 4) was estimated at three concentration levels (0.25, 0.1, and 0.05 mg kg^{-1}). Coefficients of variation were below 20% at 0.25 mg kg^{-1} concentration level and below 25% at 0.1 and 0.05 mg kg^{-1} . Detection limits calculated, as the peaks having a signal-to-noise ratio of 3 in the

chromatograms at the lowest concentration level assayed, were below 0.015 mg kg^{-1} , except for both lambda-cyhalothrin, and cyfluthrin (0.025 mg kg^{-1}). LOD values as well as the lowest concentration level validated, which can be considered as the limit of quantification of the method (LOQ) (i.e., 0.05 mg kg^{-1}), guarantees the applicability of the SPME method for the monitoring of pyrethroid residues in order to check if the maximum residue limits (MRLs) are fulfilled according to the European regulations.

The LOQ and LOD values for the SPME method developed in this paper are in line with other conventional methods including more complex sample treatment, proposed for pyrethroid residues [3, 46].

Once the recommended SPME procedure was satisfactorily validated in tomato samples and due to the similarity in moisture and fat content of tomato and strawberry matrices, it was extended to strawberry samples by just carrying out a calibration curve prepared in strawberry matrix. The results of linearity showed r^2 values in the range 0.9723–0.9995.

Figures 5 and 6 show the chromatograms obtained when applying the SPME recommended procedure to a spiked tomato and strawberry samples, respectively (0.1 mg kg^{-1} level).

Table 4 Precision ($n=6$) and limit of detection of the recommended SPME procedure for the determination of pyrethroid residues in tomato samples

	RSD (%)			LOD (mg kg^{-1})
	0.25 mg kg^{-1}	0.1 mg kg^{-1}	0.05 mg kg^{-1}	
Bifenthrin	14	14	24	0.003
Lambda-cyhalotrin	17	22	23	0.025
Permethrin	14	25	19	0.003
Cyfluthrin	17	23	18	0.025
Cypermethrin	7	23	19	0.015
Fenvalerate	17	20	20	0.010
Tau-fluvalinate	19	23	23	0.003

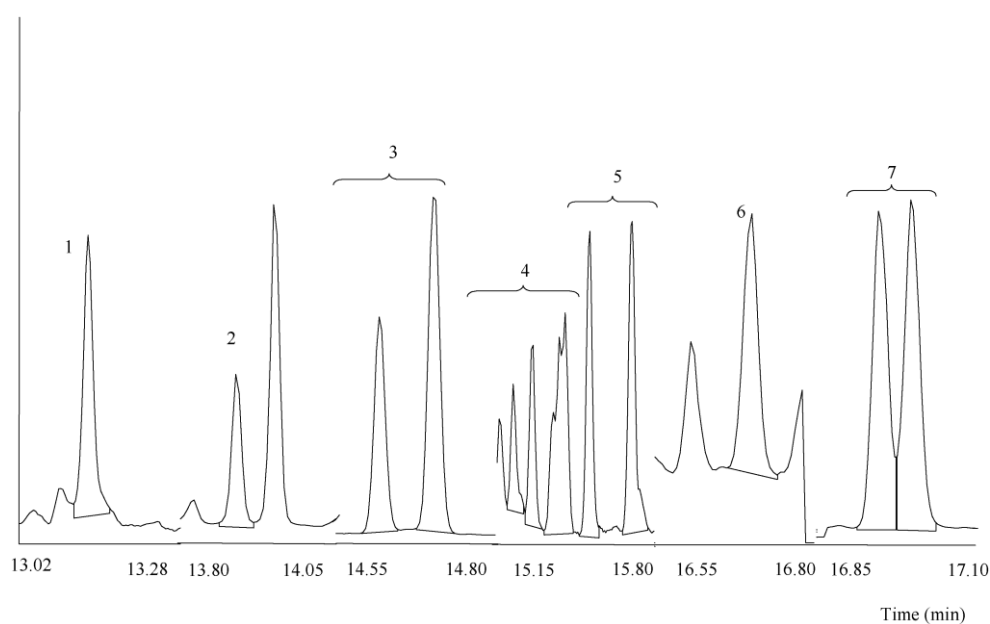


Fig. 5 GC/MS (ion chromatograms) obtained after SPME of tomato sample spiked at 0.1 mg kg^{-1} : 1 Bifenthrin (181), 2 lambda-cyhalothrin (181), 3 permethrin (183), 4 cyfluthrin (163), 5 cypermethrin (163), 6 fenvalerate (167), and 7 tau-fluvalinate (250)

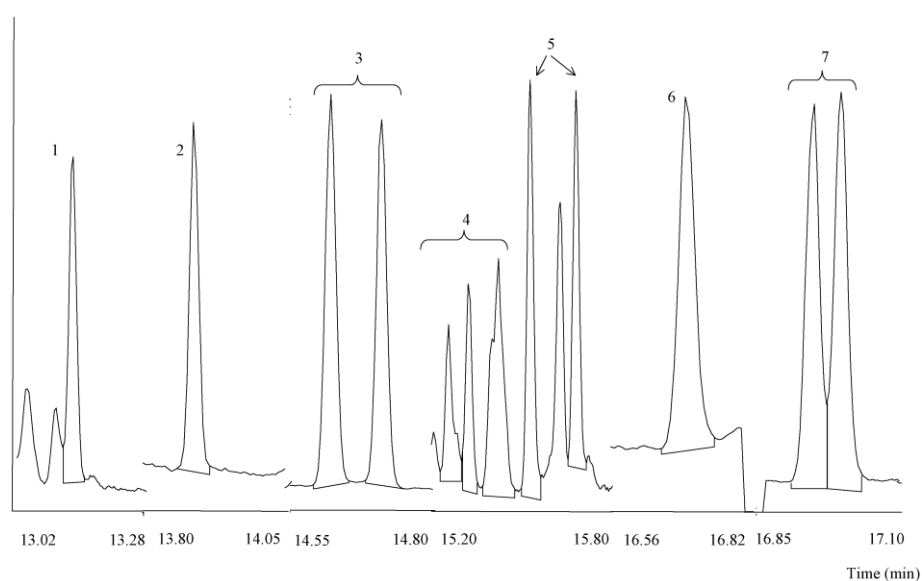


Fig. 6 GC/MS (ion chromatograms) obtained after SPME of strawberry sample spiked at 0.1 mg kg^{-1} : 1 Bifenthrin (181), 2 lambda-cyhalothrin (181), 3 permethrin (183), 4 cyfluthrin (163), 5 cypermethrin (163), 6 fenvalerate (167), and 7 tau-fluvalinate (250)

Analysis of real-world vegetable samples

The SPME procedure was routinely applied to several tomato and strawberry samples collected from experimental plots treated with lambda-cyhalothrin (using untreated samples as blank). Quantification of lambda-cyhalothrin in samples was carried out by a four-point level calibration in matrix using spiked tomato or strawberry samples (0.025 – 0.25 mg kg^{-1}) and analyzing every sample in duplicate. Concentrations of lambda-cyhalothrin found in tomato and strawberry samples were below 0.1 and 0.2 mg kg^{-1} in all samples, respectively.

In order to evaluate the applicability of the SPME method, the real samples were also analyzed by a conventional method based on extraction with a mixture of

hexane/acetone (1:1), a drying step with sodium sulfate, and a clean-up using a silica cartridge. Purified extracts were concentrated and the solvent changed to hexane before GC-MS analysis (detection limit 0.02 mg kg⁻¹).

When comparing the concentrations of lambda-cyhalothrin obtained by the SPME procedure with those obtained by the conventional method (Table 5), it was found that results differed only by a factor of 3 for all samples. Similar differences have been reported in the literature, and even with higher ratios when comparing results obtained by SPME with those obtained by conventional methods [29]. Finally, data for lambda-cyhalothrin in real samples followed the expected behavior: the concentration decreased proportionally to time elapsed since active ingredient application (dissipation curve).

Figures 7 and 8 show the chromatograms obtained from tomato and strawberry samples where lambda-cyhalothrin was detected.

In our opinion the SPME procedure developed can be considered as a good qualitative and quantitative alternative method to the more complex and time-consuming conventional existing methods, although there is still an important handicap due to the difficulty of accurate quantification, although this can be overcome in part by the use matrix-matched calibration curves.

Table 5 Summary of lambda-cyhalothrin concentrations ($\mu\text{g kg}^{-1}$) found in tomato and strawberry samples analyzed by SPME and by conventional solvent extraction

	Tomato samples		Strawberry samples	
	SPME	conventional method	SPME	conventional method
Blank	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Sample 1	25	20	25	22
Sample 2	32	20	64	32
Sample 3	41	20	174	41
Sample 4	69	28	206	68

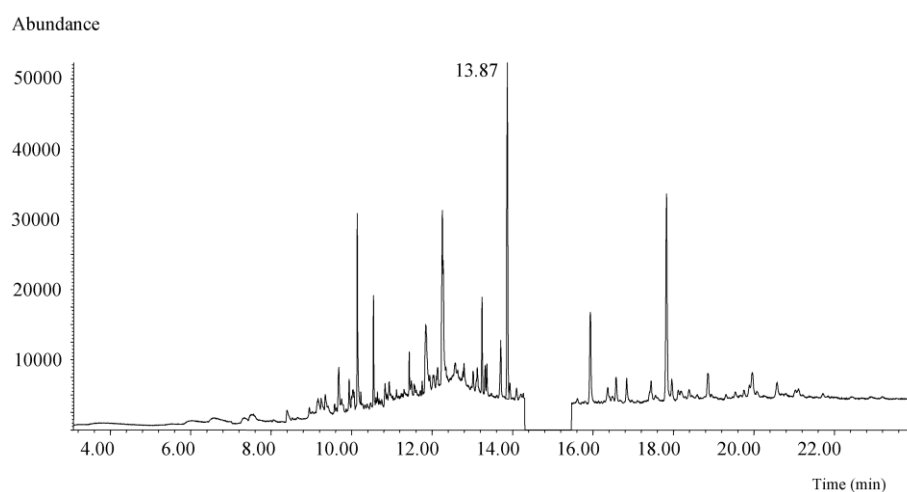


Fig. 7 GC/MS (ion chromatograms, m/z 181) obtained after application of the SPME method. Tomato sample (estimated concentrations of lambda-cyhalothrin: 0.07 mg kg^{-1})

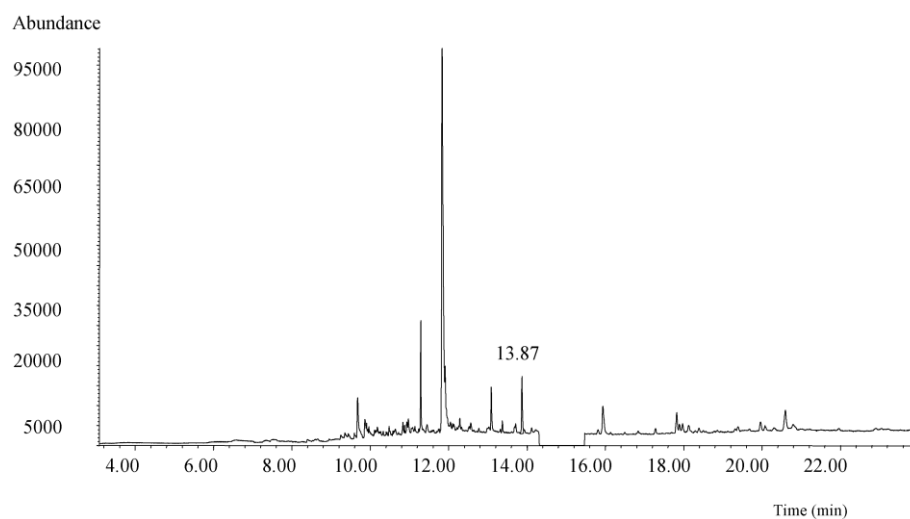


Fig. 8 GC/MS (ion chromatograms, m/z 181) obtained after application of the SPME method. Strawberry sample (estimated concentrations of lambda-cyhalothrin: 0.2 mg kg^{-1})

Acknowledgements This work forms a part of the project entitled “Simplificación de la etapa de preparación de muestra en la determinación de residuos de pesticidas mediante microextracción en fase sólida”, developed with the financial support of Fundació Caixa Castelló-Bancaixa 2000.

References

1. Schenck FJ, Lehotay SJ (2000) *J Chromatogr A* 868:51–61
2. van der Hoff GR, van Zoonen P (1999) *J Chromatogr A* 843:301–322
3. Thier HP, Kirchhoff J (1992) (eds) *Manual of pesticide residue analysis*. Deutsche Forschungsgemeinschaft, Germany
4. Horwitz W (1980) (ed) *Official methods of analysis of the association of official analytical chemists*. Holland
5. Van Zoonen P (1996) *Analytical methods for pesticide residues in foodstuffs*. Ministry of Public Health, Welfare and Sport, The Netherlands
6. Columé A, Cardenas S, Gallego M, Valcárcel M (2001) *J Chromatogr A* 912:83–90
7. Belardi RP, Pawliszyn J (1989) *Water Pollut Res J Canada* 24:179-191
8. Arthur CL, Pawliszyn J (1990) *Anal Chem* 62:2145–2148
9. Pawliszyn J (1997) *Solid phase microextraction theory and practice*. Wiley-VCH, New York
10. Beltrán J, López FJ, Hernández F (2000) *J Chromatogr A* 885:389–404
11. Kataoka H, Lord HL, Pawliszyn J (2000) *J Chromatogr A* 880:35–62
12. Hernández F, Pitarch E, Beltrán J, López FJ (2002) *J Chromatogr B* 769:65–77
13. López FJ, Pitarch E, Egea S, Beltrán J, Hernández F (2001) *Anal Chim Acta* 433:217–226

14. Snow NH (2000) *J Chromatogr A* 885:445–455
15. Kumazawa T, Suzuki O (2000) *J Chromatogr B* 747:241–254
16. Theodoris G, Koster EHM, Jong GJ (2000) *J Chromatogr B* 745:49–82
17. Hernández F, Beltrán J, López FJ, Gaspar JV (2000) *Anal Chem* 72:2313–2322
18. Zambonin CG, Palmisano F (2000) *J Chromatogr A* 874:247–255
19. Baciocchi R, Attinà M, Lombardi G, Boni MR (2001) *J Chromatogr A* 911:135–141
20. Eisert R, Jackson S, Krotzky A (2001) *J Chromatogr A* 909:29–36
21. Simplicio AL, Boas LV (1999) *J Chromatogr A* 833:35–42
22. Page BD, Lacroix G (1993) *J Chromatogr* 648:199–211
23. Lamprodou DA, Albanis TA (2002) *J Agric Food Chem* 50:3359–3365
24. Matich AJ, Rowan DD, Banks NH (1996) *Anal Chem* 68:4114–4118
25. Holt RU (2001) *J Chromatogr A* 937:107–114
26. Mestres M, Busto O, Guasch J (1998) *J Chromatogr A* 808:211–218
27. Song J, Gardner BD, Holland JF, Beaudry RM (1997) *J Agric Food Chem* 45:1801–1807
28. Song J, Fan L, Beaudry RM (1998) *J Agric Food Chem* 46:3721–3726
29. Urruty L, Fournier J, Montury M (2001) *Phytoma* 129:17–20

30. Falqui-Cao C, Fournier J, Montury M (2001) *Phytoma* 129:58–60
31. Volante M, Pontello M, Valoti L, Cattaneo M, Bianchi M, Colzani L (2000) *Pestic Manage Sci* 56:618–636
32. Hu R, Hennion B, Uturry L, Montury M (1999) *Food Addit Contam* 16:111–117
33. Wang Z, Hennion B, Uturry L, Montury M (2000) *Food Addit Contam* 17:915–923
34. Falqui-Cao C, Wang Z, Uturry L, Pommier JJ, Montury M (2001) *J Agric Food Chem* 49:5092–5097
35. Fernandez H, Padrón C, Marconi L, Ghini S, Colombo R, Sabatini AG, Girotti S (2001) *J Chromatogr A* 922:257–265
36. Sen NP, Seaman SW, Page BD (1997) *J Chromatogr A* 788:131–140
37. Eisert R, Levsen K (1995) *Fresenius J Anal Chem* 351:555-562
38. Beltran J, Lopez FJ, Cepria O, Hernandez F (1998) *J Chromatogr A* 808:257–263
39. Magdic S, Boydboland A, Jinno K, Pawliszyn J (1996) *J Chromatogr A* 736:219–228
40. Boyd-Boland AA, Magdic S, Pawliszyn J (1996) *J Chromatogr A* 121:929–938
41. Boyd-Boland AA, Pawliszyn J (1995) *J Chromatogr A* 704:163-172
42. Eisert R, Pawliszyn J (1997) *J Chromatogr* 776:293–303
43. Ai J (1997) *Anal Chem* 69:1230–1236
44. Barrionuevo WR, Lanças FM (2000) *J High Resol Chromatogr* 23:485–488

45. Sarrion MN, Santos FJ, Galceran MT (1998) J Chromatogr A 819:197–209
46. Pang G-F, Can Y-Z, Fan C-L, Zhang J-J, Li X-M, Mu J, Wang D-N, Liu S-M, Song W-B, Li H-P, Wong S-S, Kubinec R, Tekel J, Tahotna S (2000) J Chromatogr A 882:231–238

2.1.3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Durante el desarrollo del método para la determinación de piretroides se optimizaron, en primer lugar, las condiciones MS mediante la inyección en modo scan (EI) de las disoluciones patrón individuales de los compuestos objeto de estudio, de aproximadamente 5 µg/mL, lambda-cihalotrin, permetrin, ciflutrin, cipermetrin, fenvalerato y tau-fluvalinato, excepto para el bifentrin, cuya concentración aproximada fue de 1 µg/mL. Una vez obtenidos los espectros *scan* de cada piretroide, se seleccionaron al menos dos iones para el diseño del método SIM.

Optimización de las condiciones SPME

Con objeto de simplificar el proceso de optimización del método DI-SPME se seleccionaron tres piretroides representativos, lambda-cihalotrin, fenvalerato y cipermetrin.

En primer lugar, se evaluó la fase estacionaria de la fibra utilizando agua fortificada a 10 ng/mL y unas condiciones fijas de extracción y desorción. Los resultados mostraron que la fibra que mayor repuesta cromatográfica presentaba para los tres piretroides seleccionados fue la PDMS/DVB. Seguidamente, se estudió la desorción evaluando el efecto de la temperatura del inyector del GC, la profundidad de la fibra dentro del inyector y el tiempo de desorción. Los resultados mostraron que las condiciones óptimas eran: 270°C, posición de la fibra en el inyector próxima a la entrada de la columna y tiempo 5 min. Para comprobar si había efecto memoria de los piretroides en la fibra, se realizaron dos desorciones consecutivas tras una extracción de agua fortificada. La primera desorción se realizó inmediatamente después de la extracción, en la cual aparecieron los picos cromatográficos de los piretroides extraídos, y la segunda después

de haber realizado la desorción térmica en el GC, en la que no se observó la presencia de ningún pico, lo cual demostró que la primera desorción de los analitos había sido cuantitativa, y por tanto la fibra estaba en perfectas condiciones de ser utilizada de nuevo.

Teniendo en cuenta la complejidad de las matrices objeto de estudio (tomate y fresa), primero se estudiaron las condiciones de extracción en agua, ya que se trata de muestras acuosas, y posteriormente se aplicó a las muestras vegetales. Los parámetros evaluados durante la extracción fueron: adición de NaCl, temperatura y agitación. Actualmente, en nuestro grupo de investigación, después de la experiencia adquirida tras varios años de trabajo con SPME, la evaluación de diversos parámetros se realiza mediante la aplicación de métodos de optimización multivariante que permiten evaluar diversas variables simultáneamente, así como combinaciones de éstas. Sin embargo, en el momento en el que se desarrolló este trabajo se evaluaba individualmente cada variable resultando el proceso más laborioso frente a la optimización multivariante. Respecto a los resultados obtenidos, la adición de NaCl fue muy favorable para la extracción de los piretroides, ya que al aumentar la fuerza iónica del agua se vio favorecida la adsorción en la fase estacionaria de la fibra. El aumento de la temperatura también favoreció la extracción, pero hasta un cierto límite ya que cuando se sobrepasaron los 60°C se registraron pérdidas de los analitos, debido a que el calentamiento de la fibra disminuye la constante de extracción (K_{ext}) y con ello su eficiencia. La agitación suele mejorar la difusión entre las fases y los resultados obtenidos en este trabajo confirmaron este hecho, aunque pequeñas variaciones en el sistema de agitación no fueron significativas. En resumen, las condiciones óptimas de extracción fueron: adición 20% NaCl, 40°C y agitación a 120 rpm con periodo de giro de 20 s.

El tiempo de equilibrio se evaluó en dos volúmenes de muestra, 3 y 30 mL, ajustando, mediante el software MicroCal Origin, la respuesta cromatográfica obtenida frente al tiempo de extracción. En la *Figura 2 del artículo científico 1* pueden verse las curvas ajustadas para cada piretroide y volumen de muestra, y en la *Tabla 2 del artículo científico 1* los valores calculados para a y t_{eq} . El parámetro a se refiere a la rapidez con que se alcanza el equilibrio, y el t_{eq} es el tiempo necesario para extraer el 95% de la cantidad de analito en condiciones de equilibrio. Respecto a los resultados obtenidos, cabe remarcar que el aumento en el volumen de muestra provocó un notable aumento en los valores obtenidos para a y t_{eq} , siendo éstos similares para los tres piretroides. Finalmente, se seleccionó como volumen de muestra 3 mL, ya que la disminución en la cantidad de analito adsorbida se ve compensada por la reducción en el tiempo de análisis. Aun así, los t_{eq} calculados para este volumen superaron los 120 min, dificultando el rendimiento del método a la hora de ser aplicado al análisis de muestras. Teniendo en cuenta que la cantidad de analito adsorbida en la fibra es proporcional a la cantidad inicial de analito presente en la muestra (Silva, 2013), mediante el control estricto de las condiciones y el tiempo de extracción fue posible trabajar en condiciones de no equilibrio utilizando un tiempo de extracción de 30 min, de modo que la cantidad de analito extraído se redujo tan sólo un 50% respecto a las condiciones de equilibrio, consiguiéndose mejorar notablemente la productividad del método.

Finalmente, el método se extendió a los siete piretroides objeto de estudio y fue validado evaluando la linealidad, precisión y límites de detección. La *Tabla 3 del artículo científico 1* muestra los resultados de los ensayos de precisión a los tres niveles ensayados (50, 10 y 1 µg/L), y los LOD calculados estadísticamente. Los resultados obtenidos mostraron valores de RSD del orden del 20% para la mayoría de los casos a los tres niveles estudiados. Únicamente en el caso de ciflutrin y cipermetrin no fue

posible su cálculo para el nivel de 1 µg/L, debido a que la sensibilidad del método no fue suficiente y no pudieron ser detectados a ese nivel. Los LOD se calcularon estadísticamente a partir de los cromatogramas correspondientes a 1 µg/L y se encontraron en el rango 0.1-1 µg/L, a excepción de ciflutrin y cipermetrin cuyos LOD fueron calculados a partir de los cromatogramas correspondientes a 10 µg/L y se obtuvo un valor de 2 µg/L en ambos casos.

Cabe destacar que estos valores pueden considerarse poco adecuados en el análisis de aguas, pero tal y como se ha mencionado en la introducción del capítulo 2, el objetivo del presente método no fue su aplicación en análisis de aguas sino en muestras de origen vegetal. La optimización del método en muestras de agua fue un paso previo a su aplicación en muestras vegetales. En cualquier caso, el uso de mayor cantidad de volumen de muestra (hasta unos 30 mL) y mayor tiempo de extracción (hasta aproximadamente 50 min) podría mejorar la aplicabilidad del método en muestras de agua.

Así pues, seguidamente se evaluó la aplicabilidad del método DI-SPME en muestras de tomate para los siete piretroides. En primer lugar, se estudió la posibilidad de realizar la inmersión de la fibra en un extracto orgánico (acetona) de la muestra, previamente diluido con agua, y se aplicó el procedimiento optimizado para agua. Debido a la persistencia del efecto remanente (memoria) de los piretroides en la fibra, ésta tuvo que ser desechada y se descartó esta posibilidad. A continuación, se evaluó la posibilidad de introducir la fibra directamente sobre una suspensión acuosa de tomate triturado aplicando las condiciones optimizadas en agua. En este caso, no se observó efecto remanente y, tras optimizar la adición de una pequeña cantidad de disolvente orgánico (hexano/acetona, 1:1), que favoreció la extracción, se llevó a cabo la validación.

Teniendo en cuenta la complejidad de la matriz, hubiera sido interesante realizar un estudio del tiempo de equilibrio para ver posibles diferencias respecto a los valores obtenidos en agua, pero dado que la sensibilidad del método lo permitió, se mantuvo un tiempo de 30 min que aseguró un rendimiento satisfactorio del método.

El método fue validado estimando los parámetros de linealidad, precisión y límites de detección. La *Tabla 4 del artículo científico 1* muestra los resultados de los ensayos de precisión a los tres niveles evaluados (0.25, 0.1 y 0.05 mg/kg), y los LOD calculados estadísticamente. Como en el caso de la validación en agua, los valores obtenidos para la RSD fueron del orden del 20%, los cuales teniendo en cuenta la complejidad de la matriz se consideraron adecuados. De hecho, en la bibliografía consultada los métodos que realizan inmersión directa en suspensiones acuosas de muestras sólidas reportan valores similares o incluso superiores para la RSD (De Jager, 2008). Cabe destacar la buena sensibilidad del método, ya que los LODs calculados estadísticamente se hallaron en el rango 0.003-0.025 mg/kg, permitiendo su aplicabilidad para el control según la legislación vigente (Regulation (EC) No 396/2005) y la que había en el año 2003.

A fin de completar la validación del método, hubiera sido interesante incluir el estudio de la exactitud utilizando calibración en matriz, ya que, tal y como se indica en el *artículo científico 1*, la masa de piretroides recuperada respecto a la cantidad inicial añadida a la muestra se hallaba en el rango 0.4-2%, por lo que la calibración externa en solvente no resultaría adecuada. Con la evaluación de la exactitud, realizada de este modo, la robustez y aplicabilidad del método con fines cuantitativos hubiera quedado reforzada. Ahora bien, en este primer trabajo realizado en matrices vegetales, se consideró suficiente demostrar la aplicación de la metodología DI-SPME para

monitorizar, de forma rápida y sencilla, la presencia de residuos de piretroides en muestras de tomate.

Finalmente, el método desarrollado se amplió a muestras de fresa evaluando la linealidad para posteriormente aplicarse al análisis de muestras reales.

Análisis de muestras

Con el objeto de demostrar la aplicabilidad del método, se analizaron muestras de tomate y fresa, procedentes de campos experimentales tratados con lambda-cihalotrin usando tanto el método DI-SPME desarrollado, como un método convencional basado en extracción con disolvente orgánico y posterior purificación con cartuchos SPE de sílica. La *Tabla 5 del artículo científico 1* muestra los resultados obtenidos para las muestras de tomate y las de fresa al ser analizadas mediante los dos métodos. En ambos casos, la cuantificación se realizó con calibración en matriz. En el análisis mediante el método convencional se incluyeron muestras control (QCs) fortificadas a los niveles de validación (0.05 y 0.5 mg/kg), a fin de asegurar la calidad de los resultados obtenidos, pero para el método DI-SPME, dado que no se estudió la exactitud durante la validación, no se consideró la inclusión de QCs. Aunque la finalidad del método no fue cuantitativa, las muestras analizadas indicaron una variación en la concentración decreciente al incrementar los días transcurridos desde la aplicación del plaguicida en el campo, tal como se observó en la curva de disipación del lambda-cihalotrin. En las muestras 1 de tomate y fresa, *Tabla 5 del artículo científico 1*, la concentración obtenida mediante el método convencional y el método DI-SPME desarrollado fueron similares, probablemente debido a la mayor similitud entre la muestra blanco utilizada para la preparación del calibrado matriz y la muestra analizada.

Con el trabajo realizado en este capítulo se puede concluir que el método DI-SPME desarrollado presenta gran potencial en la monitorización de residuos de piretroides en muestras de tomate y fresa con excelentes prestaciones a nivel cualitativo, puesto que la sensibilidad alcanzada permite su aplicación para el control según la legislación. La principal limitación que presenta radica en la cuantificación, para lo cual se requiere un estudio más profundo de la exactitud del método así como la evaluación de las principales estrategias de cuantificación, como calibración en matriz, adiciones estándar, uso de patrones internos o aplicación de múltiple SPME, para completar la metodología a la hora de ser aplicada con una finalidad cuantitativa.

CAPITULO 3

ACOPLAMIENTO GC-MS/MS

CAPITULO 3.1

DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE CLOROTALONIL EN FRUTAS Y VEGETALES POR GC-MS/MS

3.1.1. INTRODUCCIÓN

El uso de fungicidas en agricultura es una práctica muy común a la hora de proteger los cultivos frente a infecciones por hongos y moho. Entre las diversas familias químicas con propiedades fungicidas, cabe destacar los derivados del ftalonitrilo. El compuesto más importante de este grupo es el clorotalonil, fungicida no sistémico cuya acción impide la germinación de las esporas y el desarrollo de hongos (Tomlin, 1997). Sus primeros usos se registraron en la década de 1960, hoy en día su uso es muy elevado en agricultura, horticultura y como preservante de la madera, debido a su gran espectro de acción y eficacia.

Los estudios sobre la toxicidad del clorotalonil muestran que para los organismos marinos es muy nocivo, y que debido a su uso como aditivo en las pinturas de los barcos resulta fácil encontrar residuos en el medio marino (Onduka, 2012). Así mismo, es altamente perjudicial para las aves e incluso para los seres humanos, ya que además de generar problemas gastrointestinales y severas irritaciones de la piel y los ojos (Rahman, 2013), ha sido clasificado en el grupo B2 según la EPA, como probable cancerígeno para humanos (EPA, 1999). Teniendo en cuenta su extendido uso, la elevada toxicidad y los problemas ambientales que puede ocasionar, resulta necesario desarrollar métodos de análisis sensibles y fiables capaces de controlar la presencia de residuos de clorotalonil en diversos tipos de muestras de interés ambiental y alimentario.

El metabolismo del clorotalonil en plantas y suelos genera como principal producto de transformación el 4-hidroxiclorotalonil (Roberts, 1999), el cual es mucho más tóxico que el clorotalonil; además su movilidad y persistencia en suelos es mayor (Wu, 2014). A fin de evaluar la presencia del 4-hidroxiclorotalonil en muestras vegetales, en un artículo de EFSA (EFSA, 2012) se evaluó el metabolismo del clorotalonil en cinco

grupos diferentes de cultivos, obteniendo resultados similares en todos ellos. El principal compuesto encontrado inicialmente fue el clorotalonil; en cambio, a medida que aumenta el tiempo desde la aplicación (21-28 días) la contribución del 4-hidroxiclorotalonil al residuo total aumenta considerablemente. Teniendo en cuenta que el metabolito 4-hidroxiclorotalonil presenta un mecanismo toxicológico diferente al del clorotalonil, EFSA recomienda considerar la evaluación de riesgos de ambos compuestos independientemente. Los límites máximos de residuos establecidos en la legislación europea (Regulation (EC) No 396/2005) para clorotalonil en muestras de origen vegetal únicamente incluyen al clorotalonil, excluyendo los metabolitos.

La técnica más habitualmente utilizada para la determinación de clorotalonil es la cromatografía de gases (GC) (Fussell, 2007; Hernandez, 2013; Lehotay, 2000; Lehotay, 2005; Lehotay, 2007; Lehotay, 2010; Walorczyk, 2011; Walorczyk, 2014; Wong, 2010). Hoy en día, el acoplamiento GC-MS permite la determinación e identificación de este compuesto en diversos tipos de muestras (Belmonte, 2012a; Belmonte, 2012b; Koesukwiwat, 2011; Martínez, 2014; Nieto, 2015; Portolés, 2014; Walorczyk, 2011a; Walorczyk, 2011b), con una mejora notable en la sensibilidad y selectividad, respecto al uso de detectores convencionales. De este modo, es posible el desarrollo de métodos con bajos límites de detección y cuantificación. La legislación europea (Regulation (EC) No 396/2005) establece para matrices de origen vegetal, LMRs cuyos valores están comprendidos entre 0.01 y 50 mg/kg, siendo predominantes aquellos por debajo de 5 mg/kg, por lo que es necesario el desarrollo de métodos robustos y sensibles que permitan el cumplimiento de la legislación.

La principal dificultad asociada a la determinación de clorotalonil se debe a la baja estabilidad que presenta frente a diversos factores como pH, temperatura y luz, entre

otros (Anastassiades, 2003b; Geis, 2012; Koesukwiwat, 2011; Lehotay, 2005; Lehotay, 2007; Lehotay, 2010; Mastovska, 2004; Ramírez, 2014; Walorczyk, 2011). Por ello, la mayoría de métodos multiresiduales que lo incluyen reportan pérdidas (por degradación) durante el tratamiento de muestra, que se traducen en baja precisión o pobres recuperaciones (Chai, 2012; Lehotay, 2005; Lehotay, 2007; Lehotay, 2010; Martínez, 2014; Ramírez, 2014; Walorczyk, 2011; Walorczyk, 2014; Wong, 2010a; Wong, 2010b). Entre los trabajos más recientes, Ramírez et al. (Ramírez, 2014) desarrollan un método multiresidual basado en la metodología QuEChERS para 46 pesticidas, entre los cuales se encuentra el clorotalonil, en distintas matrices vegetales del grupo del tomate basado en la técnica GC-MS (SIM). Los autores indican que no pudo realizarse la validación del método para clorotalonil, entre otros pesticidas, por incompatibilidad del método propuesto y, concretamente, debido a su degradación durante el proceso de extracción.

Los métodos multiresiduales desarrollados por Martínez et al. y Walorczyk (Martínez, 2014; Walorczyk, 2014) en suplementos alimenticios derivados del té verde y en grosella negra, respectivamente, también se centran en la metodología QuEChERS para la determinación de numerosos pesticidas mediante GC-MS/MS, entre los cuales se encuentra el clorotalonil. Ambos métodos presentan valores de recuperación para este compuesto en los extremos del rango 70-120%, o ligeramente por debajo del 70% en el caso de Walorczyk para el nivel 0.05 mg/kg.

A fin de prevenir la degradación en el caso de analitos problemáticos, Fussell et al. (Fussell, 2007a; Fussell, 2007b) consideraron la posibilidad de utilizar hielo seco durante el procesamiento en muestras vegetales, ya que las bajas temperaturas ralentizan el proceso de degradación por reacciones enzimáticas con la matriz. De este modo, se consiguió

mejorar la recuperación para clorotalonil en muestras de manzana y naranja, aunque en muestras de uva se siguieron detectando pérdidas durante el procesado.

El *artículo científico 2* que se presenta a continuación, muestra el desarrollo, validación y aplicación a muestras de campo, de un método analítico para la determinación de residuos de clorotalonil en diversas matrices de origen vegetal. El método desarrollado se basa en una extracción con disolvente orgánico y posterior purificación mediante SPE previamente al análisis por GC-MS/MS con triple cuadrupolo. En la metodología desarrollada se ha prestado especial atención a la minimización de los factores que pueden provocar la degradación del clorotalonil durante el tratamiento de muestra, evaluando la posibilidad de la adición de EDTA y ácido fórmico como preservantes.

3.1.2. ARTÍCULO CIENTÍFICO 2

A robust GC-MS/MS method for the determination of chlorothalonil in fruits and vegetables

A. Peruga, M. Barreda, J. Beltrán and F. Hernandez

Food Additives & Contaminants: Part A-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment (2013) 30 (2): 298–307

Food Additives & Contaminants: Part A, 2013
Vol. 30, No. 2, 298–307, <http://dx.doi.org/10.1080/19440049.2012.738369>



A robust GC-MS/MS method for the determination of chlorothalonil in fruits and vegetables

A. Peruga, M. Barreda, J. Beltrán and F. Hernández*

Research Institute for Pesticides and Water, University Jaume I, E-12071 Castellón, Spain

(Received 18 June 2012; final version received 6 October 2012)

Chlorothalonil is a non-systemic fungicide that is easily degraded in contact with plants and soil or even by the effect of light and pH. A method for the determination of chlorothalonil in courgettes, strawberries, oranges, leeks and tomato by solvent extraction followed by GC-MS/MS with a triple quadrupole analyser was developed. The causes of chlorothalonil degradation during sample treatment were studied and minimised. The final method was based on extraction with acetone in the presence of 0.1 M EDTA sodium salt solution, and clean-up by SPE using OASIS HLB cartridges. Isotope-labelled hexachlorobenzene (HCB-¹³C₆) was added as an internal standard to the SPE extracts before analysis by GC-MS/MS (EI) (QqQ) analysis in order to correct for instrumental deviations. Quantification was performed by matrix-matched standard calibration using relative responses to the internal standard. Two MS/MS transitions were used for mass spectrometric determination of chlorothalonil to ensure reliable quantification and confirmation. The method was validated using blank samples (for all matrices) spiked at two levels. Recoveries between 77% and 110% and an RSD below 20% were obtained for 0.1 and 0.01 mg kg⁻¹ spiking levels (*n* = 5). The validated method was applied to treated and untreated samples collected from an experimental field where a chlorothalonil formulated was applied.

Keywords: gas chromatography; mass spectrometry; chlorothalonil; vegetable samples

Introduction

Chlorothalonil (2,4,5,6-tetrachloroisophthalonitrile) is a non-systemic foliar fungicide with protective action used to control many fungal diseases in a wide range of crops (Tomlin 1997). In plants and soils chlorothalonil is easily metabolised by reductive de-chlorination, involving the displacement of the chlorine atoms by a hydroxyl group (4-hydroxy-2,5,6-trichloroisophthalonitrile), or by oxidation/hydrolysis of one of the cyano groups to the corresponding amide and acid (Roberts and Hutson 1999).

According to the European Food Safety Authority (EFSA) (2010) and European Community Regulation (EC) No. 396/2005 (European Commission 2005) maximum residue levels (MRL) for this compound are expressed as chlorothalonil concentration, excluding metabolites. A robust analytical methodology is needed for chlorothalonil determination, avoiding degradation during sample processing. For the five commodities studied in this paper, MRLs were set up at 0.01, 2, 3, 0.01, and 10 mg kg⁻¹ for courgette, tomato, strawberry, orange and leek, respectively, where 0.01 mg kg⁻¹ is the lower limit of analytical determination (European Commission 2005).

It is well documented that chlorothalonil is problematic from an analytical point of view due to its high instability (Mastovska and Lehotay 2004;

Lehotay et al. 2010; Walorczyk and Drozdowski 2011). Its determination has been traditionally carried out by extraction with organic solvent followed by an SPE or a dispersive solid-phase clean-up step and GC (Adou et al. 2001; Lehotay et al. 2005, 2010; Lehotay 2007; Hladik and Kuivila 2008; Wong et al. 2010a, 2010b). Most authors report significant losses during sample processing due to degradation of chlorothalonil to more polar and volatile metabolites, which are difficult to determine by GC or which are not included in the method. This fact explains the low recoveries (below 70%) and high RSD values (exceeding 25%) normally reported when chlorothalonil is included in multi-residue pesticide methods.

Lehotay et al. (2005, 2010) and Lehotay (2007) evaluated QuEChERS methodology and its different versions for the analysis of pesticides in vegetable samples. In the case of problematic pesticides as chlorothalonil, which are pH dependent, buffered QuEChERS methods improved recoveries and reproducibility, but in green vegetables degradation occurred even before extraction, and recoveries did not exceed 60% (Lehotay et al. 2005; Lehotay 2007). Wong et al. (2010b) reported a multi-residue method for the determination of 167 pesticides in 10 vegetable and fruit commodities. This method was based on QuEChERS extraction, and a dual clean-up procedure

*Corresponding author. Email: felix.hernandez@qfa.uji.es

A robust GC-MS/MS method for the determination of chlorothalonil in fruits and vegetables

Food Additives & Contaminants: Part A, 2013, Vol. 30, No. 2, 298–307.

A. Peruga, M. Barreda, J. Beltran and F. Hernandez*

Research Institute for Pesticides and Water, University Jaume I, E-12071 Castellón, Spain

Received 18 June 2012; final version received 6 October 2012.
<http://dx.doi.org/10.1080/19440049.2012.738369>

ABSTRACT

Chlorothalonil is a non-systemic fungicide that is easily degraded in contact with plants and soil or even by the effect of light and pH. A method for the determination of chlorothalonil in courgettes, strawberries, oranges, leeks and tomato by solvent extraction followed by GC-MS/MS with a triple quadrupole analyser was developed. The causes of chlorothalonil degradation during sample treatment were studied and minimised. The final method was based on extraction with acetone in the presence of 0.1 M EDTA sodium salt solution, and clean-up by SPE using OASIS HLB cartridges. Isotope-labelled hexachlorobenzene (HCB-¹³C₆) was added as an internal standard to the SPE extracts before analysis by GC-MS/MS (EI) (QqQ) analysis in order to correct for instrumental deviations. Quantification was performed by matrix-matched standard calibration using relative responses to the internal standard. Two MS/MS transitions were used for mass spectrometric determination of chlorothalonil to ensure reliable quantification and confirmation. The method was validated using blank samples (for all matrices) spiked at two levels. Recoveries between 77% and 110% and an RSD below

20% were obtained for 0.1 and 0.01 mg kg⁻¹ spiking levels (n = 5). The validated method was applied to treated and untreated samples collected from an experimental field where a chlorothalonil formulated was applied.

Keywords: gas chromatography; mass spectrometry; chlorothalonil; vegetable samples

* Corresponding author. Tel.: +34 964 387366; fax: +34 964 387368. *E-mail address:* felix.hernandez@qfa.uji.es (F. Hernández).

Introduction

Chlorothalonil (2,4,5,6-tetrachloroisophthalonitrile) is a non-systemic foliar fungicide with protective action used to control many fungal diseases in a wide range of crops (Tomlin 1997). In plants and soils chlorothalonil is easily metabolised by reductive dechlorination, involving the displacement of the chlorine atoms by a hydroxyl group (4-hydroxy-2,5,6-trichloroisophthalonitrile), or by oxidation/hydrolysis of one of the cyano groups to the corresponding amide and acid (Roberts and Hutson 1999).

According to the European Food Safety Authority (EFSA) (2010) and European Community Regulation (EC) No. 396/2005 (European Commission 2005) maximum residue levels (MRL) for this compound are expressed as chlorothalonil concentration, excluding metabolites. A robust analytical methodology is needed for chlorothalonil determination, avoiding degradation during sample processing. For the five commodities studied in this paper, MRLs were set up at 0.01, 2, 3, 0.01, and 10 mg kg⁻¹ for courgette, tomato, strawberry, orange and leek, respectively, where 0.01 mg kg⁻¹ is the lower limit of analytical determination (European Commission 2005).

It is well documented that chlorothalonil is problematic from an analytical point of view due to its high instability (Mastovska and Lehotay 2004; Lehotay et al. 2010; Walorczyk and Drozdynski 2011). Its determination has been traditionally carried out by extraction with organic solvent followed by an SPE or a dispersive solid-phase clean-up step and GC (Adou et al. 2001; Lehotay et al. 2005, 2010; Lehotay 2007; Hladik and Kuivila 2008; Wong et al. 2010a, 2010b). Most authors report significant losses during sample processing due to degradation of chlorothalonil to more polar and volatile metabolites, which are difficult to determine by GC or which are not included in the method. This fact explains the low recoveries (below 70%) and high RSD values

(exceeding 25%) normally reported when chlorothalonil is included in multi-residue pesticide methods.

Lehotay et al. (2005, 2010) and Lehotay (2007) evaluated QuEChERS methodology and its different versions for the analysis of pesticides in vegetable samples. In the case of problematic pesticides as chlorothalonil, which are pH dependent, buffered QuEChERS methods improved recoveries and reproducibility, but in green vegetables degradation occurred even before extraction, and recoveries did not exceed 60% (Lehotay et al. 2005; Lehotay 2007). Wong et al. (2010b) reported a multi-residue method for the determination of 167 pesticides in 10 vegetable and fruit commodities. This method was based on QuEChERS extraction, and a dual clean-up procedure involving octadecyl-bonded silica and graphised carbon black/primary–secondary amine bonded silica. Again unsatisfactory recoveries (below 60%) were obtained for chlorothalonil probably due to its degradation during sample processing that involved evaporation steps. In a similar way, Chai et al. (2012) reported recoveries between 17% and 58% for chlorothalonil when using PSA as clean-up agent during QuEChERS extraction. Adou et al. (2001) used accelerated solvent extraction for the determination of 28 pesticides in fruits and vegetables. The authors reported that the evaporation step could be responsible for non-acceptable data of chlorothalonil on at least two matrices since recoveries did not exceed 60%.

Cryogenic processing should be considered when problematic pesticides, such as chlorothalonil, are analysed. In this way, it has been reported (Fussell, Hetmanski, Colyer, et al. 2007, Fussell, Hetmanski, Macarthur, et al. 2007) that dry ice-cooled processing of fruit and vegetables improve recoveries of chlorothalonil, reducing the degradation observed during ambient temperature processing or in evaporation steps.

Moreover, experiments in dark and light conditions have demonstrated that dark media stabilises chlorothalonil, reducing the degradation rate to metabolites in the aquatic environment (Kwon and Armbrust 2006).

It is well known that GC-MS is an advantageous and powerful technique for the determination of (semi)volatile, low-polarity pesticides in vegetable samples (Lehotay et al. 2005; Fussell, Hetmanski, Colyer et al. 2007; Lehotay 2007). The application of tandem mass spectrometry (MS/MS) is a valuable approach that improves selectivity and analyte sensitivity, minimising or even removing most of the matrix interferences. In this way, ion trap (IT) or triple quadrupole (QqQ) working under MS/MS mode can achieve lower limits of detection, increasing the selectivity and specificity of the methods (Lehotay 2000) in relation to GC coupled to single MS. GC-MS/MS QqQ has become the technique of choice in the last few years due to its robustness and excellent performance for quantification at low residue levels (Pitarch et al. 2007). For confirmatory purposes, a minimum of two transitions should be acquired and the ion ratio (Q/q) between both monitored transitions calculated, thus leading to a reliable confirmation of the analyte detected in the sample (Pozo et al. 2006). Up to now very few papers dealing with the determination of chlorothalonil by GC-MS/MS QqQ have been published. Thus, the determination of chlorothalonil in vegetables and fruits has been recently reported with recoveries below 60% and RSD values up to 26% (Wong et al. 2010b). A multi-residue method for 140 pesticides has been developed, including chlorothalonil, based on buffered QuEChERS and using GC-MS/MS with a QqQ mass analyser in vegetable and fruit samples. Although LOQ for chlorothalonil was established at 0.02 mg kg^{-1} , and overall recovery and RSD were 94% and 25%, respectively, the authors clearly stated that chlorothalonil, together with captan, had recoveries under 70% and measurement uncertainty over 50% (Walorczyk and Drozdzyński 2011). In a

similar way, Brown et al. (2011) remarked on the difficulties encountered during chlorothalonil determination in fruits and vegetables.

Recently, a method has been reported based on the use of GC-MS/MS (QqQ), employing acetone as an extraction solvent and performing a partitioning with petroleum ether/dichloromethane for the determination of chlorothalonil in tomato, garlic and leek with good recoveries. The authors also stated problems in chlorothalonil determination, with recoveries in leek and garlic below 60% when using other extraction methods (Belmonte Valles et al. 2012).

The aim of this work is to develop a reliable and sensitive analytical method adequate for chlorothalonil residue determination in vegetable and fruit samples by GC-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) using a triple quadrupole analyser. Considering the need for controlling pH during extraction and taking into account previous results obtained in the determination of difficult pesticides as thiram, the use of ethylene diaminetetraacetic sodium salt (EDTA) instead of other acids such as formic acid was considered in the present work (Peruga et al. 2012).

The use of EDTA combined with a quite universal extraction method would allow future works to extend the method to multi-residue determination applications.

Materials and methods

Reagents and chemicals

Chlorothalonil (98.5%) and hexachlorobenzene $^{13}\text{C}_6$ reference standard were purchased from Dr Ehrenstorfer (Augsburg, Germany).

Residue analysis-grade acetone and ethyl acetate, and synthesis grade EDTA were purchased from ScharLab (Barcelona, Spain). LC grade water was obtained by purifying demineralised water in a Milli Q Gradient A10 (Millipore, Billerica, MA, USA). HLB cartridges (200 mg, 6 ml) were purchased from Waters (Milford, MA, USA).

A stock standard solution of chlorothalonil was prepared by dissolving approximately 50 mg of pure standard in 100 ml acetone and obtaining a final concentration of around 500 mg ml⁻¹, which was stored at -20°C. Working solutions, used for GC-MS analysis or for sample fortification, were obtained by volume diluting of the stock solution with acetone and were also stored at -20°C.

Instrumentation

GC conditions

For GC-MS determination a GC system (Agilent 6890N, Palo Alto, CA, USA) equipped with an autosampler MPS2 (Gerstel, Mulheim an der Ruhr, Germany) was coupled to a single quadrupole (Agilent 5973N), and for GC-MS/MS determination an Agilent 6890N equipped with an autosampler (Agilent 7683) was coupled to a triple quadrupole (QqQ) mass spectrometer, Quattro Micro GC (Waters, Milford, MA, USA).

The GC separations were performed in both systems using a fused silica HP-5MS capillary column with a length of 30 m x 0.25 mm i.d. and a film thickness of 0.25 μm (J&W Scientific, Folsom, CA, USA). The oven temperature was programmed as follows: 90°C (1 min); 30°C min⁻¹ to 270°C; and 5°C min⁻¹ to 300°C (5 min). Splitless injections of 1 ml were carried out with a splitless time of 1 min. Helium 99.999% (Praxair, Valencia, Spain) was used as a carrier gas at a constant flow of 1 ml min⁻¹.

MS determination

Electron ionisation (EI) in positive mode was used. The ionisation source temperature was set to 250°C and the interface temperature was set to 280°C. A solvent delay of 3 min was selected to prevent filament damage. In MS/MS (SRM) mode, argon 99.995% (Praxair) was used as a collision gas at a pressure of 2.6×10^{-3} mbar in the collision cell. The application manager Quanlynx was used to process the quantitative data.

Two MS/MS transitions were used for chlorothalonil determination, being the precursor ion the m/z 264 in both cases, 264 > 168 (quantification transition, Q), and 264 > 229 (confirmation transition, q). A dwell time/channel of 0.1 s was chosen.

Recommended procedure

A total of 20 g of triturated sample was accurately weighted and 15 ml EDTA 0.1 M aqueous solution were added. Then, 50 ml acetone were added and extraction was carried out for 2 min in a high-speed blender (IKA®-Werke GmbH & Co., Staufen, Germany). The extract was filtered through a paper filter using vacuum and adjusted to 100 ml with acetone. A total of 20 ml aliquot of this extract was five-times-diluted with deionised water and passed through an HLB SPE cartridge, previously conditioned by

passing 2.5 ml acetone and 2.5 ml deionised water. The cartridge was dried by passing air, using vacuum for at least 45 min, and then the elution was performed with 2.5 ml ethyl acetate. Prior to GC injection, 250 μl of HCB $^{13}\text{C}_6$ (100 ng ml^{-1}) were added to the final ethyl acetate extract. Laboratory lights were turned off during sample preparation and amber glass volumetric flasks were used to avoid chlorothalonil photodegradation.

Fortification of samples at two levels, 0.1 and 0.01 mg kg^{-1} , was performed by delivering 1 ml of chlorothalonil standard solution, of 2 or 0.2 mg ml^{-1} in acetone, to 20 g of sample, respectively. Fortified samples were allowed to stand for 1 h before extraction.

Quantification of chlorothalonil in samples was carried out by using matrix-matched calibration curves, prepared by spiking 20 ml of blank extract with 1 ml of adequate standard solution (of different concentration to produce each calibration level) and then it was adjusted to 100 ml with HPLC water and subjected to the SPE procedure as described above. For more reliable analytical results, at least two quality control (QC) (blank samples fortified with chlorothalonil at two levels 0.1 and 0.01 mg kg^{-1}) were included in each sample batch. Analytical results were only accepted if recoveries for QC samples were satisfactory (between 70% and 110%).

Validation study

Validation of the method was performed on the basis of the European SANCO guidelines (European Commission Directorate General for Health and Consumer Protection 2000, 2004) in five types of fruit and vegetable samples (courgette, leek, strawberry, orange and tomato), evaluating the following parameters:

- Linearity: matrix-matched calibration curves were prepared at eight concentrations between 4.4 and 1100 ng ml⁻¹.
- Accuracy: accuracy was estimated by means of recovery experiments from blank samples fortified with chlorothalonil ($n = 5$) at two concentration levels (0.01 and 0.1 mg kg⁻¹).
- Precision: the precision, expressed as the repeatability of the method, was calculated in terms of relative standard deviation (RSD) from the recovery experiments ($n = 5$) at each fortification level.
- Limit of quantification (LOQ): the LOQ objective was established as the lowest concentration level that was fully validated by applying the overall analytical procedure, with satisfactory recovery (70–110%) and precision (RSD < 20%). In addition, a statistical estimated LOQ was calculated as the peak having a signal-to-noise ratio of 10 from the chromatogram at the lowest point of the matrix-matched calibration.
- Limit of detection (LOD): the LOD was defined as the lowest concentration that the analytical process can reliably differentiate from background noise. It was estimated as the analyte concentration that produced a peak signal of three times the background noise from the chromatogram at the lowest point of the matrix-matched calibration.
- Specificity: in order to evaluate the ability of the analytical procedure to give a selective measurement for the analyte, a specificity study was carried out including the analysis of a procedure blank, a sample blank and a blank sample spiked with chlorothalonil at the LOQ level.

The ratio between the intensity of the quantification transition (**Q**, m/z 264 > 168) and the confirmation transition (**q**₁, m/z 264 > 229) was used as a confirmatory parameter of chlorothalonil detected in samples. Firstly, the theoretical average Q/q ratio was calculated from matrix-matched standard solutions. The identity of chlorothalonil in samples was confirmed by comparison of the experimental Q/q ratio in the sample with the theoretical Q/q ratio. Maximum tolerance depends on the value of Q/q ratio according to SANCO guidelines (European Commission Directorate-General for Health and Consumer Protection 2009): 20% for Q/q ratios lower than 2; 25% for Q/q ratios between 2 and 5; 30% for Q/q ratios between 5 and 10; and 50% for Q/q ratios higher than 10. In our case, the mean Q/q ratio for chlorothalonil calculated from matrix-matched calibration standards was 1.8, thus the maximum deviation allowed was 20% to confirm peak identity.

Results and discussion

Method development was carried out using GC-MS with a single quadrupole. After optimisation of selected ion monitoring (SIM) conditions using standard solutions, and considering that the chlorothalonil spectrum shows only relevant peaks for molecular cluster, two ions at m/z 264 and 266 were chosen from the full-scan spectra.

According to previous work with compounds of behaviour similar to chlorothalonil, in terms of problems during extraction or evaporation a general scheme of sample preparation was considered. This scheme consisted of organic solvent extraction that has to be changed to the aqueous phase (through dilution for water-miscible solvents as acetone or by evaporation and re-dissolution with water for non-water-miscible solvents), followed by SPE clean-up using typical reversed-phase cartridges.

In a first approach, we decided to use acetone as the extraction solvent. First experiments were carried out using Milli-Q water spiked with chlorothalonil in acetone studying the effect of different acetone contents (5%, 10% and 20%) over SPE efficiency using Oasis HLB cartridges. The results obtained indicated that up to 20% of acetone in the aqueous phase led to similar results compared with those with pure water. The same trend was observed when blank courgette extracts were spiked with chlorothalonil and then subjected to SPE. Elution was carried out in all cases with 2.5 ml of ethyl acetate.

The next step was to study the efficiency of acetone as an extracting agent in this particular case. Thus, a triturated sample of courgette was spiked with chlorothalonil at 2.5 mg kg^{-1} , left to stand for 1 h and extracted with acetone. The extract was five times diluted with Milli-Q water and then submitted to SPE as described above. Results led to

recoveries below 40%, this not being adequate for correct validation of the method. Thus, different extracting solvents were used, considering hexane and ethyl acetate. In both cases it was necessary to evaporate the extract to dryness under gentle nitrogen stream at 40°C and then re-dissolve in Milli-Q water before applying SPE procedure. Again results were not satisfactory in terms of recoveries (below 20%), and in any case the results obtained were worse than that obtained for acetone extraction, probably due to the evaporation stages including those already reported as problematic for some authors (Adou et al. 2001; Wong et al. 2010b).

Considering that chlorothalonil is a problematic analyte during extraction (Mastovska and Lehotay 2004; Lehotay et al. 2010) and that it is sensitive to basic conditions, the use of preservatives during sample extraction was tested. The addition of EDTA or HCOOH as a stabilising agent was evaluated. EDTA was selected due to its ability to form chelates with matrix components, and taking into account previous experiences in our facilities (Peruga et al. 2012). Besides, it might avoid degradation by overcoming enzymatic reactions. HCOOH was selected due to its acid character, since it has been reported that chlorothalonil is a base-sensitive pesticide and the addition of a strong acid might avoid losses (Mastovska and Lehotay 2004).

Three different extractions of a blank courgette sample (20 g) with 50 ml of acetone were carried out: one by adding 15 ml EDTA 0.1 M before extraction; another by adding 15 ml HCOOH 0.01% before extraction; and the last one without adding any stabiliser. Then, 20 ml aliquot of the extract were fortified by adding 1 ml of chlorothalonil standard (250 ng ml⁻¹) and diluted five times with deionised water before purification using the SPE procedure indicated above. After cartridge elution with 2.5 ml

ethyl acetate, 250 µl of HCB $^{13}\text{C}_6$ were added to the extract before injection in the GC-MS system.

Figure 1 shows the effect of the different preservatives studied. Degradation of chlorothalonil was evident in the case of adding HCOOH (Figure 1c) or without stabiliser (Figure 1a). EDTA led to the highest response (Figure 1b) and thus it was selected as stabiliser for further optimisation. In order to evaluate the optimum concentration of EDTA solution to be added to the sample, different concentrations were tested ($n = 3$): 0.01, 0.025, 0.05, 0.1 and 0.2 M. Results showed that concentrations below 0.1 M did not avoid degradation of chlorothalonil and there were not significant improvement over no addition. In the case of concentrations, 0.1 and 0.2 M recoveries were similar in both cases, and around 65–70%. Therefore, 0.1 M was selected.

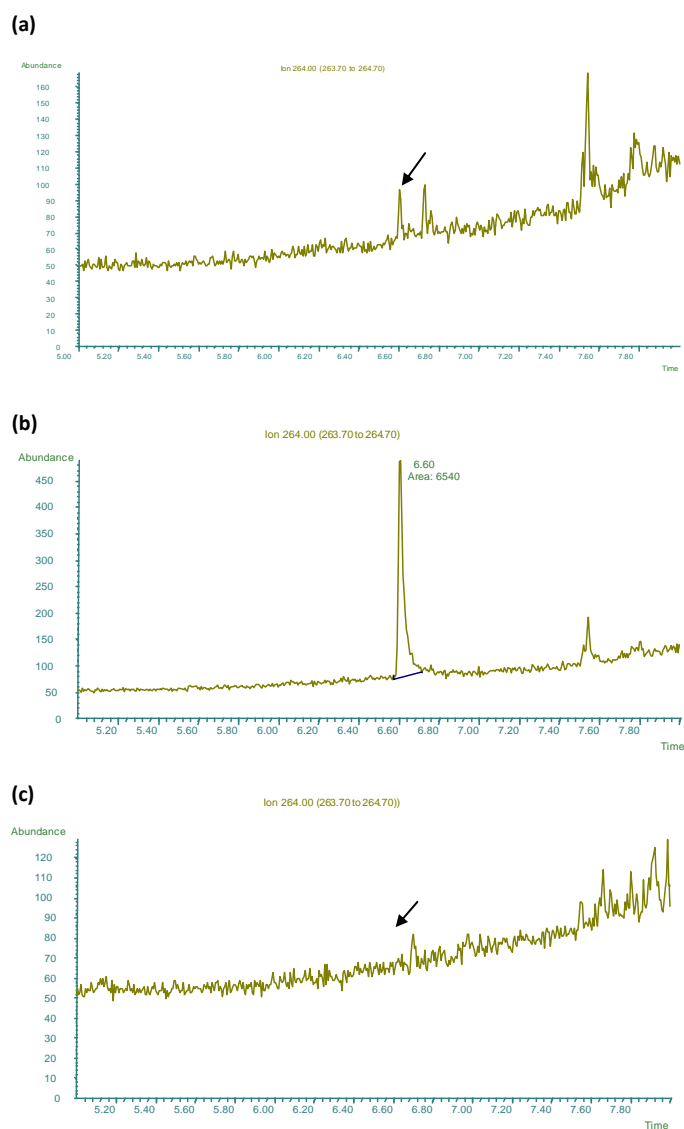


Figure 1. Effect of adding stabilising agents before extraction: (a) without stabiliser, (b) after adding 15 ml of EDTA 0.1 M, and (c) after adding 15 ml of HCOOH 0.01%.

As reported in the literature (Sakkas et al. 2002; Kwon and Armbrust 2006), chlorothalonil can also be degraded when exposed to sunlight or artificial light. Its degradation depends highly on matrix composition. We observed that light conditions (sunlight and artificial fluorescent light) during spiking, extraction and the clean-up steps promoted degradation of chlorothalonil which was detected as an important decrease in peak area. On the contrary, dark conditions (no sunlight or artificial light, and using brown-coloured volumetric material) inhibited degradation. Thus, the later conditions were used in subsequent experiments, as recoveries calculated for spiked samples at 0.03 mg kg⁻¹ level were over 80%.

Considering at this point the applicability of the method to vegetable samples and taking into account that MRLs for food matrices included in this study are set up to between 0.01 and 0.1 mg kg⁻¹ depending on the sample type considered, the developed method was tested at 0.01 mg kg⁻¹ in order to ensure its usefulness for monitoring chlorothalonil in fruits and vegetables. The results were not satisfactory as method sensitivity after GC-MS determination was not high enough to achieve this level. The application of an evaporation step either before or after SPE was considered and in all cases recoveries obtained for chlorothalonil were not satisfactory.

From our experiences it was concluded that extract pre-concentration under a gentle nitrogen stream at 40°C led to low recoveries, probably due to chlorothalonil losses in this process. This fact contrasts with some published papers. Thus, although there is a general agreement that chlorothalonil is a difficult analyte, some authors (Smalling and Kuivila 2008) report good recoveries when extracting chlorothalonil from sediments in a multi-residue method, even after pre-concentration using TurboVap or N₂. Some losses of chlorothalonil were reported when extraction temperature

(microwave-assisted extraction–MAE) was higher than 100°C, but no data on temperature used during the pre-concentration of the extracts were given. Other authors (Przybylski and Hommet 2008) indicate that the use of HCOOH during QuEChERS extraction increased the response of chlorothalonil, probably due to a protection of reactive functions of particles. Although the authors do not calculate recoveries, they define and calculate sensitivity factors in different vegetable matrices (comparing response between standards in solvent and matrix-matched standards). The lowest factors in that work were reported for chlorothalonil, indicating an extreme decrease in response in matrix-matched standards, reaching factors down to 0.05 for green beans. Perhaps this was related to losses of chlorothalonil due to the presence of certain matrix components or to the N₂ evaporation (as in the present work). Recently, Guan et al. (2010) applied a multi-residue QuEChERS method for the determination of pesticides in carrot and orange samples without carrying out any pre-concentration step, and they reported good recoveries for chlorothalonil after analysis by GC-MS.

In order to improve sensitivity but avoiding the concentration steps, the determination of chlorothalonil by GC-MS/MS with a triple quadrupole analyser was considered. The base peak of the full MS spectra (m/z 264) was selected as a precursor ion, and different collision energies (between 10 and 30 eV) were tested in order to develop a SRM method with at least two MS/MS transitions for chlorothalonil (only the most sensitive transition was monitored for the internal standard). Selecting m/z 264 as the precursor ion, two product ions were obtained: the most abundant ion at m/z 168 was used for quantification (Q); it showed its maximum response at a collision energy of 20 eV and could be explained by the loss of [CCl₂N]. The other product ion, at m/z 229, was used for confirmation (q); it was optimised at collision energy of 15 eV and could be explained by the loss of [Cl]. Under the indicated conditions it was feasible to reach the

objective quantitation limit of 0.01 mg kg⁻¹ due to the better sensitivity of the GC-MS/MS method developed.

Once the parameters that affect the extraction of chlorothalonil, its stability and measurement are optimised, the method developed was validated using samples spiked at 0.01 and 0.1 mg kg⁻¹. The results of validation carried out in five types of vegetable and fruit samples (leek, tomato, strawberry, orange, and courgettes) are shown in Table 1.

Table 1. Results of quantitative validation for chlorothalonil in five sample matrices.

Matrix	Linearity (n=3), r	Accuracy and Precision		LOQ	
		(Recoveries and RSD %) (n=5)		(statistical)	LOD
		0.01 mg kg ⁻¹	0.1 mg kg ⁻¹	(mg/Kg) ^(a)	(mg/Kg)
Courgette	0.9998	84 (6)	82 (4)	0.003	0.001
Leek	1.0000	78 (12)	82 (20)	0.003	0.0008
Tomato	0.9998	78 (9)	106 (5)	0.003	0.0009
Strawberry	0.9992	77 (6)	82 (15)	0.003	0.001
Orange	0.9991	102 (8)	110 (1)	0.003	0.001

Note: Statistical LOQ estimated for S/N=10.

The linearity of the method was studied using matrix-matched calibration curves, which showed a good fit (using relative areas to internal standard) to a second-order equation between 4.4 and 1100 ng ml⁻¹ for all matrices tested. Suitable correlation coefficients (>0.99) and residuals (<30%) were obtained in all cases. The method

presented satisfactory recoveries and precision with average recoveries between 77 and 110% at the two levels assayed and RSD below 15%, except for leek at the highest level that showed an RSD of 20%. Leek is considered a complex matrix, and because of a high amount of sulphur-derivative groups, chlorothalonil can be trapped and its extraction became more difficult (Belmonte Valles et al. 2012). This could explain the high, yet acceptable, RSD value obtained for this kind of matrix; even so, recoveries obtained for chlorothalonil in leek were still satisfactory (similarly to the results published by Belmonte Valles et al. 2012).

The limits of detection and quantitation for chlorothalonil were estimated from chromatograms obtained for the lowest point of the matrix-matched calibration in the five matrices giving values of around 0.001 and 0.003 mg kg⁻¹, respectively. From the results obtained it can be concluded that the developed method is fully applicable to the determination of chlorothalonil in vegetable products, accomplishing the requirements described in the SANCO guidelines (according to linearity, precision and accuracy). Moreover, the calculated LOQ for chlorothalonil is more than three times lower than the lowest established MRL for the studied matrices, thus allowing its application in real sample studies.

As regards confirmation of chlorothalonil in samples, when the developed method was applied to samples at the objective LOQ level (0.01 mg kg⁻¹), the Q/q ratios calculated had deviations less than 20% in all cases, thus accomplishing that indicated in the SANCO guidelines (European Commission Directorate-General for Health and Consumer Protection 2009).

Moreover, the lowest point of matrix-matched calibration (4.4 ng ml⁻¹) corresponds to a sample concentration of 0.003 mg kg⁻¹, the LOQ calculated statistically

(with a signal-to-noise ratio of 10), it still being feasible to use the Q/q ratios at this level for a reliable confirmation of the presence of chlorothalonil in samples.

Figure 2 shows the chromatograms corresponding to blank samples, samples spiked at 0.01 mg kg^{-1} and calibration standards of 11 ng ml^{-1} for all studied matrices.

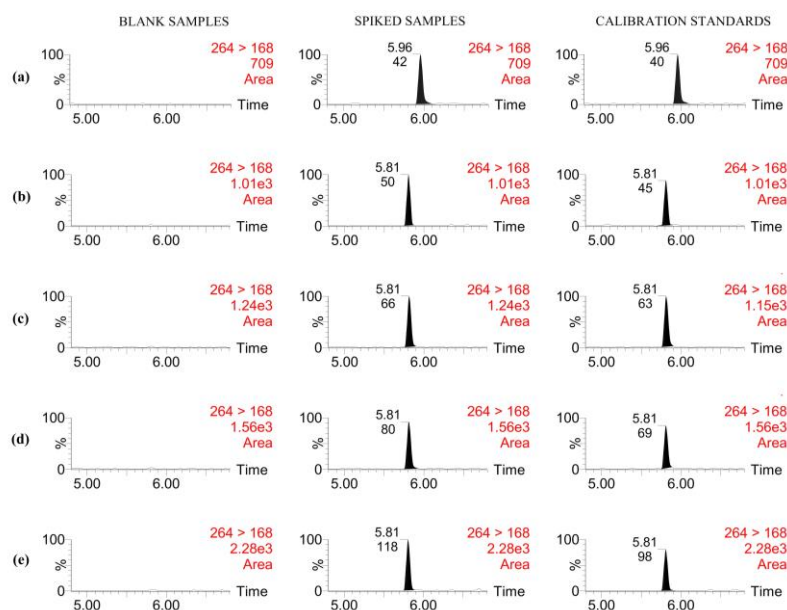


Figure 2. Chromatograms corresponding to method validation. Blank sample, sample spiked at 0.01 mg kg^{-1} (concentration in final extract = 16 ng ml^{-1}), and a matrix-matched calibration standard of 11 ng ml^{-1} : (a) courgette, (b) leek, (c) tomato, (d) strawberry and (e) orange.

Finally, the method developed was applied to the analysis of samples obtained from residue trials carried out in plots where applications of chlorothalonil were performed. Figure 3 shows two positive samples of courgettes at 0.04 and 0.09 mg kg^{-1} , together with the quality control samples and matrix-matched calibration points close to these levels. As can be seen, Q/q ratio values calculated for real samples (as well as

for quality control samples) are in good agreement with the theoretical values calculated for calibration standards with deviations below 12% in all cases. Q/q ratio accomplishment is better for the most concentrated samples.

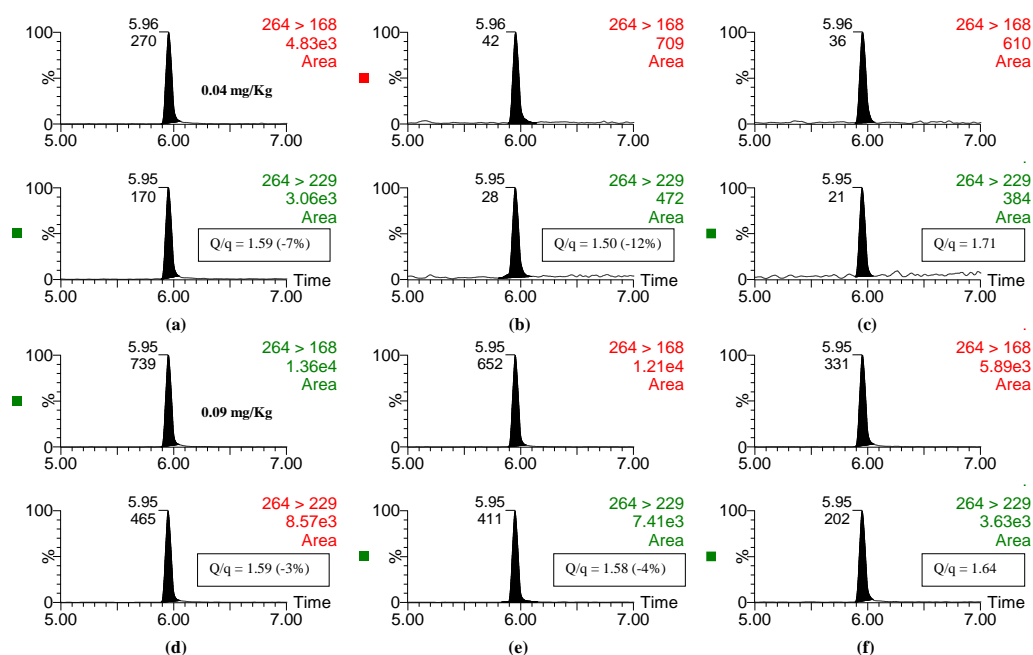


Figure 3. Courgette chromatograms of: (a) a real sample (0.04 mg kg⁻¹), (b) QC at 0.01 mg kg⁻¹ (recovery = 72%), (c) a matrix- matched standard at 10 ng ml⁻¹, (d) a real sample (0.09 mg kg⁻¹), (e) QC at 0.1 mg kg⁻¹ (recovery = 83%), and (f) a matrix- matched standard at 100 ng ml⁻¹. Q/q ratios and deviations from those of matrix-matched standards are also shown in the chromatograms.

Conclusions

This paper presented a reliable and robust method for the determination of chlorothalonil in vegetable and fruit samples, and it avoided most of the reported problems related to chlorothalonil degradation during the analytical procedure. The use of EDTA as a preservative, working in the absence of direct light and the elimination of evaporation steps were the most important issues tackled to reach satisfactory results.

The use of GC-MS/MS with a triple quadrupole analyser and the selection of two SRM transitions, one for quantification and the other for confirmation, gave excellent selectivity and sensitivity. GC-MS/MS has been shown to be a key tool for the quantitative determination of chlorothalonil at a low residue level with a still reliable identification.

Acknowledgements

The authors acknowledge the support of Generalitat Valenciana, as a research group of excellence (Prometeo 2009/054).

References

- Adou K, Bontoyan WR, Sweeney PJ. 2001. Multiresidue method for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables by accelerated solvent extraction and capillary gas chromatography. *J Agric Food Chem.* 49(9):4153–4160.
- Belmonte Valles N, Retamal M, Martinez-Uroz MA, Mezcua M, Fernandez-Alba AR, de Kok A. 2012. Determination of chlorothalonil in difficult-to-analyse vegetable matrices using various multiresidue methods. *Analyst.* 137(10):2513–2520.
- Brown AN, Cook JM, Hammack WT, Stepp JS, Pelt JV, Gerard G. 2011. Analysis of pesticides residues in fresh produce using buffered acetonitrile extraction and amino-propyl cleanup with gas chromatography/triple quadrupole mass spectrometry, liquid chromatography/triple quadrupole mass spectrometry, gas chromatography/ion trap detector mass spectrometry, and GC with a halogen-specific detector. *J AOAC Int.* 94(3):931–941.
- Chai L, Zaidel N, Hansen HCB. 2012. A rapid multi-residue method for the determination of pesticide residues in choy sum, yardlong beans and aubergines. *Food Chem.* 131(2):611–616.
- European Commission. 2005. Commission Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC. Brussels (Belgium): European Commission.
- European Commission Directorate-General for Health and Consumer Protection. 2000. SANCO/3029/99 rev. 4. Residues: guidance for generating and reporting methods of

analysis in support of pre-registration data requirements for Annex II (part A, Section 4) and Annex III (part A, Section 5) of Directive 91/414. Brussels (Belgium): European Commission Directorate-General for Health and Consumer Protection.

European Commission Directorate-General for Health and Consumer Protection. 2004. SANCO/825/00 rev. 7. Guidance document on pesticide residue analytical methods. Brussels (Belgium): European Commission Directorate-General for Health and Consumer Protection.

European Commission Directorate-General for Health and Consumer Protection. 2009. SANCO/10684/2009. Method validation and quality control procedures for pesticides residues analysis in food and feed. Brussels (Belgium): European Commission Directorate-General for Health and Consumer Protection.

European Food Safety Authority (EFSA). 2010. Modification of the existing MRLs for chlorothalonil in barley and several food commodities of animal origin. EFSA J. 8(3):1–42.

Fussell RJ, Hetmanski MT, Colyer A, Caldwell M, Smith F, Findlay D. 2007. Assessment of the stability of pesticides during the cryogenic processing of fruits and vegetables. *Food Addit Contam.* 24(11):1247–1256.

Fussell RJ, Hetmanski MT, Macarthur R, Findlay D, Smith F, Ambrus A, Brodesser PJ. 2007. Measurement uncertainty associated with sample processing of oranges and tomatoes for pesticide residue analysis. *J Agric Food Chem.* 55(4):1062–1070.

- Guan H, Brewer WE, Garriss ST, Morgan SL. 2010. Disposable pipette extraction for the analysis of pesticides in fruit and vegetables using gas chromatography/mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 1217(12):1867–1874.
- Hladik ML, Kuivila KM. 2008. Analysis of chlorothalonil and three degradates in sediment and soil. *J Agric Food Chem*. 56(7):2310–2314.
- Kwon J, Armbrust KL. 2006. Degradation of chlorothalonil in irradiated water/sediment systems. *J Agric Food Chem*. 54(10):3651–3657.
- Lehotay SJ. 2000. Analysis of pesticide residues in mixed fruit and vegetable extracts by direct sample introduction/ gas chromatography/tandem mass spectrometry. *J AOAC Int*. 83(3):680–697.
- Lehotay SJ. 2007. Determination of pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate: collaborative study. *J AOAC Int*. 90(2):485–520.
- Lehotay SJ, Mastovska K, Lightfield AR. 2005. Use of buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables. *J AOAC Int*. 88(2):615–629.
- Lehotay SJ, Son KA, Kwon H, Koesukwiwat U, Fu W, Mastovska K, Hoh E, Leepipatpiboon N. 2010. Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. *J Chromatogr A*. 1217(16):2548–2560.

- Mastovska K, Lehotay SJ. 2004. Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues. *J Chromatogr A*. 1040(2):259–272.
- Peruga A, Grimalt S, Lopez FJ, Sancho JV, Hernandez F. 2012. Optimisation and validation of a specific analytical method for the determination of thiram residues in fruits and vegetables by LC-MS/MS. *Food Chem*. 135:186–192.
- Pitarch E, Medina C, Portoles T, Lopez FJ, Hernandez F. 2007. Determination of priority organic micro-pollutants in water by gas chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. *Anal Chim Acta*. 583(2):246–258.
- Pozo OJ, Sancho JV, Ibanez M, Hernandez F, Niessen WMA. 2006. Confirmation of organic micropollutants detected in environmental samples by liquid chromatography tandem mass spectrometry: achievements and pitfalls. *Trac – Trend Anal Chem*. 25(10):1030–1042.
- Przybylski C, Hommet F. 2008. Evaluation of some parameters affecting troublesome pesticide analysis in gas chromatography-ion-trap mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 1201(1):78–90.
- Roberts T, Hutson D. 1999. Metabolic pathways of agrochemicals. In: Jewess PJ, Lee PW, Nicholls PH, Plimmer JR, editors. Part two: insecticides and fungicides. Cornwall: Royal Society of Chemistry. p. 1380–1384.
- Sakkas VA, Lambropoulou DA, Albanis TA. 2002. Study of chlorothalonil photodegradation in natural waters and in the presence of humic substances. *Chemosphere*. 48(9):939–945.

- Smalling KL, Kuivila KM. 2008. Multi-residue method for the analysis of 85 current-use and legacy pesticides in bed and suspended sediments. *J Chromatogr A*. 1210(1):8–18.
- Tomlin CDS. 1997. *The pesticide manual*. Farnham (UK): British Crop Protection Council. p. 227–229.
- Walorczyk S, Drozdowski D. 2011. Development and validation of a routine multiresidue method for determining 140 pesticides in fruits and vegetables by gas chromatography/tandem quadrupole mass spectrometry. *J AOAC Int*. 94(5):1625–1642.
- Wong JW, Zhang K, Tech K, Hayward DG, Krynetsky AJ, Cassias I, Schenck FJ, Banerjee K, Dasgupta S, Brown D. 2010a. Multiresidue pesticide analysis of ginseng powders using acetonitrile- or acetone-based extraction, solid-phase extraction cleanup, and gas chromatography-mass spectrometry/selective ion monitoring (GC-MS/SIM) or tandem mass spectrometry (GC-MS/MS). *J Agric Food Chem*. 58(10):5884–5896.
- Wong JW, Zhang K, Tech K, Hayward DG, Makovi CM, Krynetsky AJ, Schenck FJ, Banerjee K, Dasgupta S, Brown D. 2010b. Multiresidue pesticide analysis in fresh produce by capillary gas chromatography-mass spectrometry/selective ion monitoring (GC-MS/SIM) and - tandem mass spectrometry (GC-MS/MS). *J Agric Food Chem*. 58(10):5868–5883.

3.1.3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Optimización de las condiciones de MS

El desarrollo y optimización del método analítico se realizó en primer lugar utilizando GC-MS con cuadrupolo simple, seleccionando para el método SIM los iones m/z 264 y 266. La sensibilidad alcanzada con esta técnica fue insuficiente para alcanzar los bajos niveles de concentración pretendidos, por lo que se consideró llevar a cabo la determinación de clorotalonil utilizando un GC-MS/MS con analizador de triple cuadrupolo. En este caso, se realizaron experiencias de fragmentación con los iones m/z 264 y 266, correspondientes al ion molecular de clorotalonil con ^{35}Cl ($\text{C}_8^{35}\text{Cl}_4\text{N}_2^+$) y ^{37}Cl ($\text{C}_8^{35}\text{Cl}_3^{37}\text{ClN}_2^+$). Tras fragmentar estos iones precursores en la celda de colisión, se obtuvieron mayoritariamente dos iones producto, uno debido a la pérdida de un Cl (m/z 229 y 231) a 15 eV de energía de colisión, y otros dos más abundantes (m/z 168 y 170) correspondientes a la pérdida de $[\text{CCl}_2\text{N}]$ aplicando 20 eV. La Figura 3.1 ilustra los espectros tanto de scan (modo MS) como de iones producto (modo MS/MS) para los iones precursores m/z 264 y 266 a las dos energías de colisión ensayadas (20 y 15 eV)

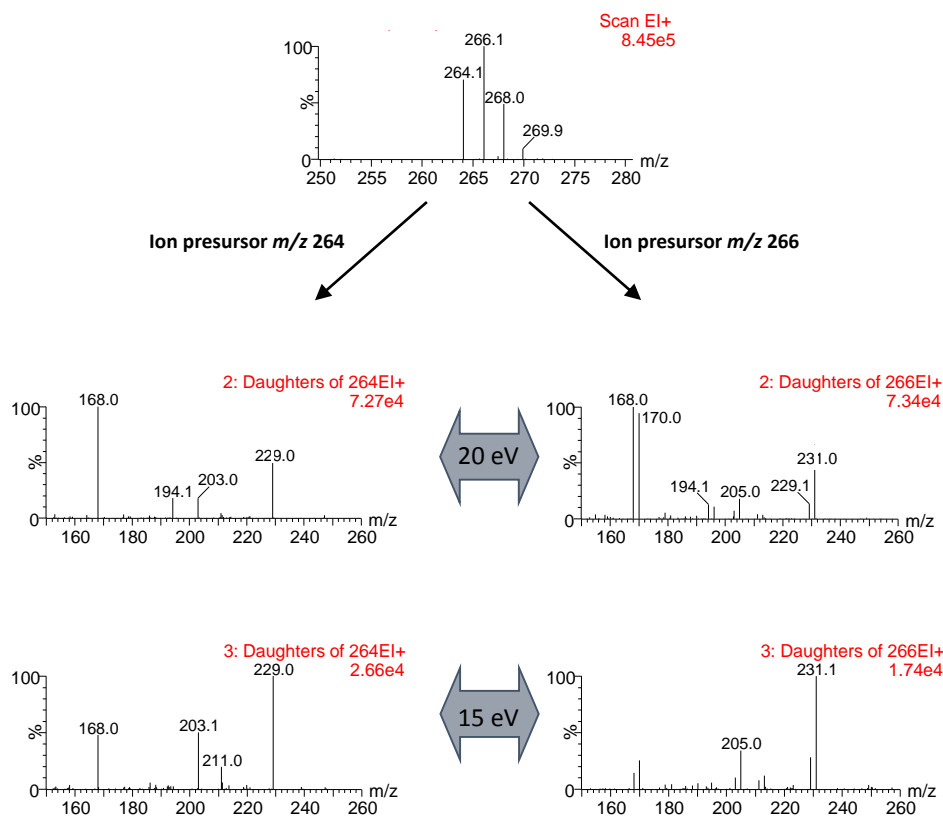


Figura 3.1. Espectro de masas en modo scan (arriba), espectros de iones producto (MS/MS) para los iones precursor m/z 264 (abajo izda) y m/z 266 (abajo dcha) a 20 y 15 eV.

A fin de seleccionar las condiciones de máxima sensibilidad, se inyectó un patrón en solvente de clorotalonil (100 ng/mL) seleccionando las transiciones SRM: 264>168, 264>229, 266>170 y 264>231. Los resultados mostraron que, aunque en el espectro de scan el ion m/z 266 es más abundante, la fragmentación de m/z 264 resulta ligeramente más favorable en cuanto a respuesta analítica, ya que la relación S/N es similar. La Figura 3.2 muestra los cromatogramas obtenidos tomando como iones precursor m/z 264 (izda.) y 266 (dcha.).

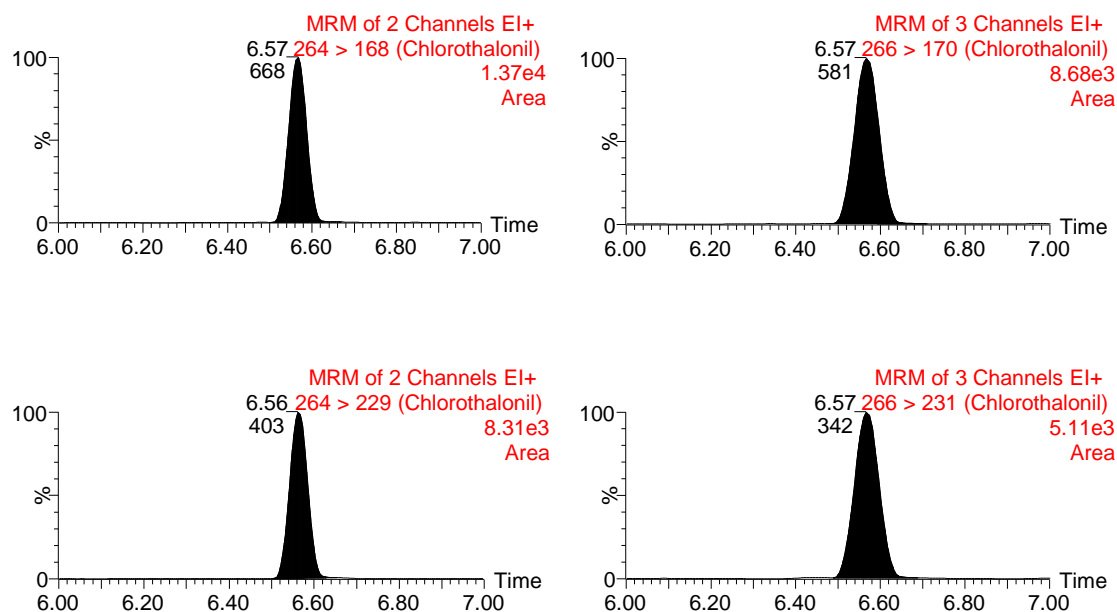


Figura 3.2. Cromatogramas GC-MS/MS correspondientes a un patrón de 100 ng/mL de clorotalonil obtenidos durante la selección de las condiciones de MS/MS.

Con el fin de utilizar las condiciones de máxima selectividad, las transiciones seleccionadas fueron 264>168 para cuantificación (Q) y 264>229 para confirmación (q).

Adicionalmente, se incluyó el uso de hexaclorobenceno- $^{13}\text{C}_6$ (HCB- $^{13}\text{C}_6$) como patrón interno, para mejorar la reproducibilidad del método utilizando áreas relativas al patrón interno. Para el patrón interno se seleccionó únicamente la transición 292>257, correspondiente a la pérdida de un Cl.

Estudio de la etapa de extracción

Tal y como se ha mencionado con anterioridad, el principal objetivo del presente trabajo fue desarrollar un método sensible y robusto para la determinación de residuos de clorotalonil en diversas matrices vegetales. El método desarrollado se ha basado en una extracción con disolvente orgánico y posterior purificación mediante SPE previamente a la medida por GC-MS/MS. En la metodología desarrollada se ha prestado especial atención a la degradación del clorotalonil durante el tratamiento de muestra con el objeto de minimizar en lo posible este efecto indeseable.

Para llevar a cabo la etapa de purificación, teniendo en cuenta las características físico-químicas del clorotalonil, se consideró adecuado realizarla mediante SPE en fase inversa. La fase estacionaria seleccionada fue OASIS HLB que, según la experiencia de nuestro laboratorio, soporta porcentajes relativamente altos de disolvente orgánico sin registrar pérdidas de analito por disminución de la capacidad de retención. Se comprobó que en el caso de una muestra de agua fortificada con clorotalonil, la eficiencia de la retención no variaba si se aumentaba hasta un 20% el contenido de acetona en el medio acuoso, siendo éste el disolvente preseleccionado para realizar la extracción. La elución de los cartuchos se realizó con acetato de etilo debido a su compatibilidad con el sistema cromatográfico lo cual evitaba etapas de evaporación y cambio de disolvente que, tal como indica la bibliografía (Adou, 2001; Wong, 2010b), pueden provocar importantes pérdidas de clorotalonil. Tras la elución de los cartuchos SPE con acetato de etilo, se añadió 250 µL de HCB-¹³C₆ 100 ng/mL previa a la inyección en el GC-MS.

La matriz elegida para continuar con el proceso de optimización fue el calabacín. Los primeros ensayos de recuperación se realizaron utilizando muestra de calabacín fortificada a 2.5 mg/kg, aplicando el proceso general de extracción con acetona y

posterior purificación por SPE. Los resultados en términos de recuperación no fueron satisfactorios, por lo que se realizó un cambio en el disolvente de extracción por si se trataba de un problema en la eficiencia de la misma. Los disolventes ensayados fueron hexano y acetato de etilo, pero tratando de mantener la etapa de purificación optimizada, se incluyó una etapa de evaporación y cambio de disolvente para compatibilizar con la extracción en fase sólida. Las pérdidas de clorotalonil fueron mayores, probablemente, debido a pérdidas en la evaporación (Adou, 2001). Así pues, siendo conocida la problemática en la degradación del clorotalonil durante el tratamiento de muestra (Anastassiades, 2003b; Geis, 2012; Koesukwiwat, 2011; Lehotay, 2005; Lehotay, 2007; Lehotay, 2010; Mastovska, 2004; Ramírez, 2014; Walorczyk, 2011), los malos resultados obtenidos se atribuyeron a problemas de degradación y no de eficiencia en la extracción o en la etapa de SPE, por lo que se evaluó la posibilidad de añadir conservantes durante la extracción con acetona.

Según la bibliografía, el clorotalonil es un compuesto sensible a pH básico, que puede degradarse por contacto con los componentes de la matriz vegetal, e incluso por la acción de la luz. En primer lugar, se evaluó la adición de HCOOH y EDTA previa a la extracción con acetona, fortificando posteriormente una alícuota del extracto con clorotalonil a 12.5 ng/mL. Tras aplicar el proceso SPE e inyectar en el sistema GC-MS, se observó que la adición de EDTA parecía estabilizar el clorotalonil, mientras que el HCOOH favoreció la degradación prácticamente total. En la *Figura 1 del artículo científico 2* puede observarse el efecto de los preservantes evaluados sobre los cromatogramas finales obtenidos, así como el resultado cuando no se utiliza ningún preservante. Tras establecer la concentración óptima de EDTA en 0.1 M, se obtuvieron recuperaciones del orden del 65-70%, ligeramente por debajo del límite aceptado según las guías SANCO. Finalmente, teniendo en cuenta que la luz natural y artificial, puedes

ser otro factor de degradación (Kwon, 2006) aunque dependiente de la matriz, se ensayaron condiciones de oscuridad, manteniendo la muestra fortificada protegida de la luz y utilizando material volumétrico ámbar en todo momento. De este modo se consiguió aumentar la recuperación en muestras fortificadas a 0.03 mg/kg hasta el 80% aproximadamente.

El LOQ objetivo del método se estableció en 0.01 mg/kg, nivel más bajo que pretendía ser validado. Sin embargo, la sensibilidad con el equipo GC-MS utilizado no permitió alcanzar dicho nivel, sin aplicar etapa de pre-concentración (inviable en este caso debido a las pérdidas de clorotalonil que se producen en dichas etapas). Por ello, se evaluó la posibilidad de utilizar la técnica GC-MS/MS QqQ disponible en nuestro laboratorio. Los resultados en términos de sensibilidad fueron plenamente satisfactorios, y una vez optimizado el método en todas sus etapas, se realizó la validación tanto de calabacín como del resto de matrices estudiadas al nivel de 0.01 mg/kg utilizando esta técnica.

En resumen, el método desarrollado consistió en extraer la muestra con agitación usando Ultraturrax y acetona como disolvente en presencia de EDTA, aplicando purificación posterior mediante SPE en fase inversa con cartuchos OASIS HLB. El extracto eluido con AcOEt se analizó mediante GC-MS/MS sin llevar a cabo ninguna etapa de evaporación del extracto. La cuantificación se llevó a cabo mediante calibración en matriz.

Validación y análisis de muestras

El método se validó siguiendo la guía SANCO/825/00 rev.8.1 (European Commission 2010) en muestras de calabacín, tomate, puerro, fresa y naranja, obteniéndose resultados satisfactorios en cuanto a linealidad, así como precisión y exactitud para los dos niveles de concentración ensayados (0.01 y 0.1 mg/kg). Los límites de detección y cuantificación estadísticos (calculados como la concentración que produce un pico de relación S/N de 3 y 10, respectivamente), estimados a partir del nivel más bajo del calibrado para las cinco matrices estudiadas, presentaron valores alrededor de 0.001 y 0.003 mg/kg, respectivamente, poniendo de manifiesto la gran sensibilidad del método desarrollado y su aplicabilidad para el cumplimiento de los LMRs comunitarios.

Finalmente, la aplicabilidad del método se demostró tras analizar más de 50 muestras de calabacín procedentes de distintas parcelas en las que se había aplicado clorotalonil siguiendo buenas prácticas agrícolas. En cada secuencia de análisis se incluyeron dos muestras blanco fortificadas a los dos niveles validados (QCs) a fin de garantizar la fiabilidad de los resultados obtenidos. En la *Figura 3 del artículo científico 2*, se muestran a modo de ejemplo dos muestras positivas de clorotalonil, junto con un QC y un patrón en matriz correspondiente a cada secuencia de análisis. La relación de intensidades entre la transición de cuantificación y la de confirmación (Q/q ratio) en las muestras positivas, en los QCs analizados, así como en las Q/q teóricas del patrón en matriz, mostró desviaciones relativas por debajo del 12%, valor por debajo de las tolerancias máximas permitidas por la Unión Europea ($\pm 30\%$) (European Commission 2013).

Hoy en día, las dificultades analíticas asociadas a la determinación de residuos de clorotalonil en matrices vegetales siguen estando presentes en la mayoría de métodos multirresiduales debido a su inestabilidad durante el procesamiento de muestra y a la necesidad de un tratamiento diferenciado para este fungicida. El procedimiento desarrollado en esta Tesis presenta un importante avance, ya que incorpora el uso de EDTA como preservante, que inhibe la degradación durante la aplicación del procedimiento analítico, así como el uso de material ámbar para minimizar la fotodegradación de este compuesto.

CAPITULO 3.2

DETERMINACIÓN DE METILISOTIOCIANATO EN SUELOS Y AGUA MEDIANTE HS-SPME SEGUIDO DE GC-MS/MS

3.2.1. INTRODUCCIÓN

La desinfección de suelos en agricultura se realiza para eliminar aquellos parásitos que se generan por la repetición de ciclos de cultivos, tanto en invernaderos como en parcelas al aire libre, antes de sembrar de nuevo. De este modo, se trata de eliminar insectos, hongos, malas hierbas, etc. mediante procedimientos físicos o aplicación de productos químicos que permitan regenerar la fertilidad del suelo y con ello mejorar o mantener la calidad de las cosechas. Los métodos físicos se basan, generalmente, en la aplicación de calor procedente de la energía solar, o de la aplicación de vapor de agua. Estas técnicas resultan muy eficaces, pero su elevado coste y la duración del tratamiento hacen que su uso sea limitado y se vean desplazadas por la aplicación de desinfectantes químicos. Existe gran cantidad de productos químicos con propiedades polivalentes que se utilizan para la desinfección de suelos. Muchos de ellos presentan a la vez efecto fungicida, nematicida, herbicida e insecticida, en mayor o menor grado.

El metam sodio, metam potasio y dazomet son desinfectantes genéricos de suelos con gran eficacia como fungicidas, insecticidas, nematicidas y herbicidas (Di Primo, 2003). Concretamente, el metam sodio es uno de los desinfectantes más usados a nivel mundial ya que, además, se plantea como alternativa a otros compuestos altamente tóxicos como el bromuro de metilo (Bretaudeau, 2011). El responsable de la eficacia desinfectante de este compuesto es el metilisotiocianato (MITC), un producto de degradación que se genera rápidamente cuando entra en contacto con la humedad del suelo (Dourson, 2010).

El MITC es un compuesto tóxico y muy volátil que se difunde por el suelo en fase gas y puede fácilmente llegar a la atmósfera. Por ello, los principales problemas toxicológicos asociados a la aplicación de fumigantes que generan MITC, se deben a la

emisión de éste a la atmósfera provocando la exposición tanto de los agricultores como de otras personas que se encuentran cerca de la zona de aplicación. Los efectos que provoca la exposición a MITC dependen de los niveles de concentración y de la duración de la misma, abarcando desde la irritación de los ojos o la piel hasta la muerte (Bretau, 2011; Cain, 2010; Dourson, 2010). Hoy en día, las técnicas utilizadas para la aplicación de fumigantes que generan MITC (como cubrir el suelo con un plástico, con una capa de agua, o comprimir el suelo tras la aplicación) permiten reducir las emisiones, consiguiendo garantizar la salubridad de las personas cercanas y, a la vez, asegurar una adecuada concentración de MITC en el suelo para que su efecto desinfectante sea máximo (Littke, 2013; Ou, 2006; Simpson, 2010; Wang, 2005).

Para proteger la calidad del suelo y de los futuros cultivos manteniendo un control sobre la contaminación, la guía SANCO 825/00 rev. 8.1 propone realizar el control de las sustancias activas o de los metabolitos relevantes seleccionados, en función de la ecotoxicidad y de la evaluación del riesgo que presenten. Por este motivo, teniendo en cuenta la elevada toxicidad del MITC, este compuesto se considera relevante en análisis de suelos, y por ello deben desarrollarse métodos analíticos suficientemente sensibles. La guía SANCO825/00 (European Commission, 2010) establece un LOQ objetivo para los residuos de plaguicidas en suelos de 0.05 mg/kg.

La mayor parte de los artículos consultados sobre la determinación de MITC en muestras de suelo están enfocados hacia la evaluación de su comportamiento, es decir hacia cómo se distribuye en el suelo tras la aplicación, como minimizar su volatilización frente distintas técnicas de aplicación, cómo interacciona con otros fumigantes, etc. Generalmente, la determinación de MITC se realiza mediante la extracción directa del suelo con un disolvente orgánico (Dungan, 2003; Stiles, 2000; Zhang, 2005), mediante el

bombeo del aire de los poros del suelo, seguido de la retención del MITC utilizando tubos de carbón activo y elución con disolventes orgánicos (Candole, 2007; Ou, 2006; Simpson, 2010), o también aplicando la técnica HS-SPME (Di Primo, 2003; Sanon, 2002; Triky, 2007; Triky, 2009). Casi ninguno de estos artículos tiene como objetivo el desarrollo de metodología analítica fiable, por lo que no suelen mencionar sus características analíticas, como precisión y exactitud, y únicamente se reportan algunos límites de detección, en ocasiones con valores elevados, debido al uso de GC acoplada a un detector no específico (NPD o FID). En el caso de Fuster et al. (Fuster, 2005), sí se describe con detalle el desarrollo y características analíticas de un método basado en HS-SPME para la determinación de MITC y 1,3-dicloropropeno en suelos mediante GC-ECD (NPD). El método se validó a 0.02 y 0.2 mg/kg, y se estimó un LOD de 0.001 mg/kg, resultando adecuado para asegurar el cumplimiento de la legislación.

Debido a la volatilidad del MITC, la técnica más utilizada para su determinación ha sido la cromatografía de gases (GC), generalmente acoplada a detectores convencionales como NPD o FID (Candole, 2007; Dungan, 2003; Fuster, 2005; Ou, 2006; Simpson, 2010; Stiles, 2000; Zhang, 2005). Actualmente, el uso de espectrometría de masas, y en particular GC-MS/MS, permite una determinación más fiable en cuanto a confirmación e identificación de pesticidas que las técnicas basadas en analizadores convencionales, viéndose mejorada tanto la selectividad como la sensibilidad de los métodos desarrollados (Hernandez, 2013).

Hoy en día, la aplicación de la técnica HS-SPME para la determinación de analitos volátiles está bastante extendida; sin embargo, la cuantificación en el caso de muestras complejas, como son los suelos, sigue resultando uno de sus puntos más débiles. Tal como se ha mencionado en el capítulo de introducción, la aproximación múltiple

headspace SPME (MHS-SPME) es, a priori, una alternativa a métodos tradicionales de cuantificación como adiciones estándar o calibrado matriz, y permite realizar la cuantificación utilizando un calibrado externo en solvente. No obstante, es imprescindible resaltar que la aplicabilidad de esta metodología depende en gran medida del comportamiento del analito así como de la eficiencia de la extracción en la fibra.

En el *artículo científico 3* se presenta el desarrollo y validación de un método novedoso basado en HS-SPME para la determinación de MITC en muestras de agua y suelo utilizando GC-MS/MS QqQ. Se hace especial hincapié en la evaluación del potencial de HS-SPME en modo convencional y múltiple para realizar la cuantificación, así como en la optimización de las condiciones MS/MS a fin de obtener máxima sensibilidad. A la vista de la búsqueda bibliográfica realizada, este es el primer método publicado para la determinación de MITC mediante GC-MS/MS.

3.2.2. ARTÍCULO CIENTÍFICO 3

Determination of methylisothiocyanate in soil and water by HS-SPME followed by GC–MS–MS with a triple quadrupole

Aranzazu Peruga, Joaquim Beltrán, Francisco López and Félix Hernández

Analytical and Bioanalytical Chemistry (2014) 406: 5271–5282

Anal Bioanal Chem (2014) 406:5271–5282
DOI 10.1007/s00216-014-7960-z

RESEARCH PAPER

Determination of methylisothiocyanate in soil and water by HS-SPME followed by GC–MS–MS with a triple quadrupole

Aranzazu Peruga · Joaquim Beltrán · Francisco López · Félix Hernández

Received: 26 March 2014 / Revised: 29 May 2014 / Accepted: 6 June 2014 / Published online: 20 June 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract Methylisothiocyanate (MITC) is the main degradation product of metam sodium, a soil disinfectant widely used in agriculture, and is responsible for its disinfectant properties. Because MITC is highly toxic and volatile, metam sodium has to be applied in a manner that tries to reduce atmospheric emissions but still maintains adequate concentration of MITC in soil to ensure its disinfectant effect. Thus, monitoring of MITC concentrations in soil is required, and to this end sensitive, fast, and reliable analytical methods must be developed. In this work, a headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) method was developed for MITC determination in water and soil samples using gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC–MS–MS) with a triple-quadrupole analyzer. Two MS–MS transitions were acquired to ensure the reliable quantification and confirmation of the analyte. The method had linear behavior in the range tested (0.026–2.6 ng mL⁻¹ in water, 1–100 ng g⁻¹ in soil) with *r*² over 0.999. Detection limits were 0.017 ng mL⁻¹ and 0.1 ng g⁻¹ in water and soil, respectively. Recoveries for five replicates were in the range 76–92 %, and RSD was below 7 % at the two spiking levels tested for each matrix (0.1 and 1 ng mL⁻¹ for water, 4 and 40 ng g⁻¹ for soil). The potential of using multiple HS-SPME for analyzing soil samples was also investigated, and its feasibility for quantification of MITC evaluated. The developed HS-SPME method was applied to soil samples from experimental plots treated with metam sodium following good agriculture practices.

Keywords GC–MS–MS · Triple quadrupole · Metam sodium · Methylisothiocyanate (MITC) · Soil · Pesticides

A. Peruga · J. Beltrán · F. López · F. Hernández (✉)
Research Institute for Pesticides and Water, University Jaume I,
12071 Castellón, Spain
e-mail: hermandf@uji.es

Introduction

Metam sodium (sodium *N*-methylthiocarbamate) is a soil disinfectant with fungicide, insecticide, and nematocide properties derived from its main degradation product, methylisothiocyanate (MITC). In the presence of water, metam sodium breaks down into the active and volatile compound MITC, which diffuses into the soil as a gas. Degradation of metam sodium and diffusion of MITC in soil are complex processes that depend on the pH of the soil, temperature, soil moisture, organic matter, and soil composition [1–3].

Metam sodium application is authorized for soils intended for cultivation of flowers, strawberries, vegetables, seedbeds, tobacco, and vineyards, both in open fields and in greenhouses. MITC is a toxic, water-soluble, and volatile compound [4]. Because of its toxicity [5], the main environmental problem associated with metam sodium application is MITC emission to the atmosphere, which may affect farmers and populations living or working near fumigated fields [6]. To reduce MITC emissions but retain, for some time, an adequate concentration in the soil to ensure a disinfecting effect, there are different methods of application, including sealing the soil with a plastic cover [7], surface water sealing [8, 9], or soil tamping [10].

Metam sodium is extensively used for a wide variety of crops [11]. A Pesticide Action Network (PAN) report indicates that the amount of metam sodium used in 2010 in several European countries varied from 670,000 kg in Portugal to 6,500,000 kg in France [12]. Because of its extensive use and because it is applied directly to the soil (by soil injection or through drip-irrigation), it is highly recommended that MITC should be monitored in soils to which metam sodium has been applied, following the procedure for substances the SANCO guideline defines as “relevant for monitoring” [13].

 Springer

Determination of methylisothiocyanate in soil and water by HS-SPME followed by GC–MS–MS with a triple quadrupole

Analytical and Bioanalytical Chemistry (2014) 406: 5271–5282

Aranzazu Peruga, Joaquim Beltrán, Francisco López and Félix Hernández

Research Institute for Pesticides and Water, University Jaume I, E-12071 Castellón, Spain

Received: 26 March 2014 /Revised: 29 May 2014 /Accepted: 6 June 2014 /Published online: 20 June 2014. DOI 10.1007/s00216-014-7960-z

Abstract

Methylisothiocyanate (MITC) is the main degradation product of metam sodium, a soil disinfectant widely used in agriculture, and is responsible for its disinfectant properties. Because MITC is highly toxic and volatile, metam sodium has to be applied in a manner that tries to reduce atmospheric emissions but still maintains adequate concentration of MITC in soil to ensure its disinfectant effect. Thus, monitoring of MITC concentrations in soil is required, and to this end sensitive, fast, and reliable analytical methods must be developed. In this work, a headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) method was developed for MITC determination in water and soil samples using gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC–MS–MS) with a triple-quadrupole analyzer. Two MS–MS transitions were acquired to ensure the reliable quantification and confirmation of the analyte. The method had linear behavior in the range tested (0.026– 2.6 ng mL⁻¹ in water, 1–100 ng g⁻¹ in soil) with r^2 over 0.999. Detection limits were 0.017 ng mL⁻¹ and 0.1 ng g⁻¹ in water and soil, respectively. Recoveries for five replicates were in the range 76–92%, and RSD was below 7% at the two spiking levels

tested for each matrix (0.1 and 1 ng mL⁻¹ for water, 4 and 40 ng g⁻¹ for soil). The potential of using multiple HS-SPME for analyzing soil samples was also investigated, and its feasibility for quantification of MITC evaluated. The developed HS-SPME method was applied to soil samples from experimental plots treated with metam sodium following good agriculture practices.

Keywords

GC–MS–MS; Triple quadrupole; Metam sodium; Methylisothiocyanate (MITC); Soil; Pesticides

* Corresponding author. Tel.: +34 964 387366; fax: +34 964 387368. *E-mail address:* felix.hernandez@qfa.uji.es (F. Hernández).

Introduction

Metam sodium (sodium N-methyldithiocarbamate) is a soil disinfectant with fungicide, insecticide, and nematocide properties derived from its main degradation product, methylisothiocyanate (MITC). In the presence of water, metam sodium breaks down into the active and volatile compound MITC, which diffuses into the soil as a gas. Degradation of metam sodium and diffusion of MITC in soil are complex processes that depend on the pH of the soil, temperature, soil moisture, organic matter, and soil composition [1–3].

Metam sodium application is authorized for soils intended for cultivation of flowers, strawberries, vegetables, seedbeds, tobacco, and vineyards, both in open fields and in greenhouses. MITC is a toxic, water-soluble, and volatile compound [4]. Because of its toxicity [5], the main environmental problem associated with metam sodium application is MITC emission to the atmosphere, which may affect farmers and populations living or working near fumigated fields [6]. To reduce MITC emissions but retain, for some time, an adequate concentration in the soil to ensure a disinfecting effect, there are different methods of application, including sealing the soil with a plastic cover [7], surface water sealing [8, 9], or soil tamping [10].

Metam sodium is extensively used for a wide variety of crops [11]. A Pesticide Action Network (PAN) report indicates that the amount of metam sodium used in 2010 in several European countries varied from 670,000 kg in Portugal to 6,500,000 kg in France [12]. Because of its extensive use and because it is applied directly to the soil (by soil injection or through drip-irrigation), it is highly recommended that MITC should be monitored in soils to which metam sodium has been applied, following the procedure for substances the SANCO guideline defines as “relevant for monitoring” [13].

The SANCO guideline establishes that a limit of quantification for pesticide residues in soil of 0.05 mg kg^{-1} must be reached, so sensitive analytical methods must be developed for compliance with legislation.

MITC has been measured in soil-pore air, through pumping and subsequent retention in charcoal tubes followed by solvent elution, as indicated for atmospheric emissions [7, 8, 14]. Solvent extraction from soil by use of ethyl acetate has been also reported [2, 15–17].

It is well known that headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) is a good extraction technique when dealing with volatile analytes, typically followed by gas chromatography (GC) analysis [18]. HS-SPME has been used in pesticide-residue analysis of fruit and vegetables [19–23] and of environmental samples, including soils, sediments, and water [24–33]. Despite the extensive use of HS-SPME in pesticide-residue analysis, only a few papers deal with MITC determination. In most cases, it has been used in studies of MITC behavior in soils, using analytical methods with very high LOQ (in the upper mg kg^{-1}) [34–37]. Fuster et al. [38] described the use of a procedure for determination of MITC in soil samples by HS-SPME followed by GC-ECD, which could be validated at 20 ng g^{-1} level with a LOD of 1 ng g^{-1} .

The physico-chemical characteristics of MITC and the performance of HS-SPME for sample preparation make this technique attractive, and a good alternative to traditional techniques for MITC determination in soil, because it enables the combining of extraction and GC-injection steps, minimizing sample preparation.

Quantification using SPME may be problematic when dealing with complex-matrix samples. An interesting approach for improving quantification is the use of multiple-

headspace mode (MHS-SPME). This technique is based on the estimation of the response (peak area) for the total amount of analyte present in the sample by performing a single SPME extraction and applying an experimentally fitted mathematical equation. MHS-SPME has the advantage that quantification can be achieved in complex matrices by use of external calibration in solvent. The theoretical total area (A_T) can be calculated by the following equation [39]:

$$A_T = \frac{A_1}{1-\beta} \quad (1)$$

where A_1 is the peak area obtained in the first SPME extraction, and β is a parameter, characteristic for each analyte, that depends on the sample matrix and on the extraction conditions. It is calculated from the linear regression of the logarithms of individual peak areas when performing several consecutive extractions from the same sample:

$$\log A_i = (i-1) \cdot \log \beta + \log A_1 \quad (2)$$

where A_i is the peak area obtained in the i th extraction [40].

It has been reported that MHS-SPME is feasible only when β is within the range 0.4–0.95 [39, 41]. A β value below 0.4 implies that the analyte would be totally removed from the sample in the first extraction as a result of the significant reduction of the analyte amount in the sample from one extraction to the next, whereas a value over 0.95 implies too low an extraction efficiency.

Chromatographic determination of MITC has commonly been performed using non-selective detectors including NPD or ECD [7, 8, 14–16, 38], which have evident limitations in residue analysis because of their poor selectivity and the lack of

information on the identity of analytes. GC coupled to tandem mass spectrometry (GC–MS–MS) is a powerful technique that provides excellent selectivity and sensitivity, and enables the reliable identification and quantification of analytes. GC–MS–MS has been extensively used in pesticide-residue analysis [42], using ion trap (IT) and, more recently, triple-quadrupole (QqQ) analyzers.

The objective of this work is to investigate the potential of conventional and multiple HS-SPME followed by GC–MS–MS (QqQ) for quantitative MITC determination in water and soil samples, an approach that has not been applied to MITC analyses before now. HS-SPME GC–MS–MS offers the advantages of simple and solvent-free sample treatment, resulting from the characteristics of SPME, and the improvement in selectivity and sensitivity associated with the use of tandem mass spectrometry.

Material and methods

Reagents and chemicals

Methylisothiocyanate reference standard was purchased from Pestanal (Sigma-Aldrich, Seelze, Germany).

Residue analysis grade acetone, ethyl acetate, and methanol were purchased from Scharlab (Barcelona, Spain). Carbon disulfide was purchased from Sigma-Aldrich (Seelze, Germany). LC grade water was obtained by purifying demineralized water in a Milli-Q Gradient A10 (Millipore, Billerica, MA, USA).

A stock standard solution of MITC was prepared by dissolving approximately 50 mg pure standard in 100 mL acetone, obtaining a final concentration of approximately 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, which was stored at -20°C . Working solutions used for GC–MS–MS analysis and for sample fortification were obtained by volume dilution with ethyl acetate and acetone, respectively, and were also stored at -20°C .

Samples

Ground-water samples used for accuracy and precision experiments were obtained from a well located in Castellon (west of Spain). Distilled water was used for procedure optimization and for linearity evaluation.

Soil samples were obtained from three locations in Spain. The untreated soil sample used for extraction optimization, validation (linearity), and matrix-matched calibration in analysis of samples was collected from an open plot in Toledo (Spain). This soil was characterized, and contained 1.2% organic matter and had a pH of 7.7. Another untreated soil sample was obtained from Castellon and was used (after fortification) for

accuracy and precision evaluation. This soil contained 1.8% organic matter and its pH was 7.4. In both cases, the soils were regarded as having a sandy-clay texture. Treated soil samples from a greenhouse in Sevilla (1.6% organic matter, pH 7.2, sandy texture) and from the Toledo plot were used to test the applicability of the method to real-world samples.

Instrumentation

SPME material

The SPME device for manual extraction consisted of a holder assembly and several replaceable fibers, and was purchased from Supelco (Madrid, Spain). Six different fiber types were compared: polyacrylate (PA, 85 μm); carboxen–poly(dimethylsiloxane) (CAR–PDMS, 75 μm); divinylbenzene–carboxen–poly(dimethylsiloxane) (DVB–CAR–PDMS, 50/ 30 μm); poly(dimethylsiloxane) (PDMS, 100 μm); poly(dimethylsiloxane)–divinylbenzene (PDMS–DVB, 65 μm); and polyethylene glycol (PEG, 60 μm).

SPME fibers were conditioned before their first use as recommended by the manufacturer, by heating them in the injection port of the chromatography system for 0.5–1 h at 240–300°C, depending on the fiber coating.

GC conditions

A GC system Agilent 6890N (Palo Alto, USA) equipped with a split/splitless injection port and an autosampler (Agilent 7683) was coupled to a triple-quadrupole (QqQ) mass spectrometer, Quattro Micro GC (Micromass, Boston, USA). The GC separation was performed using a BP-624 capillary column (30 m \times 0.25 mm i.d., film thickness 1.4 μm) (SGE Analytical Science, Milton Keynes, United Kingdom). Injector temperature and

initial flow were investigated during the study, the final conditions being fixed as: helium 99.999% (Praxair, Valencia, Spain) used as carrier gas at initial flow of 3 mL min⁻¹ (0.75 min) and then at a constant flow of 1 mL min⁻¹; injector temperature set to 300°C (3 min splitless time); oven temperature programmed as follows: 60°C (3 min); 20°C min⁻¹ 80°C; 5°C min⁻¹ 100°C; 20°C min⁻¹ 120°C (1 min).

MS determination

In the final recommended procedure, the QqQ mass spectrometer was operated in electron ionization (EI) mode, although chemical ionization (CI) in positive mode was also studied during MS optimization. Final conditions for both sources were:

Electron ionization: Ionization source temperature was set to 250°C, and interface temperature was set to 280°C. Two MS–MS transitions were used for MITC determination: 73>72 (quantification transition, Q) and 72>75 (confirmation transition, q).

Chemical ionization: Ionization source temperature was set to 200°C, and interface temperature was set to 250°C. Methane 99.9999% (Praxair) was selected as CI gas, and flow was adjusted to 40%. Two MS–MS transitions were used: 74>47 (quantification transition, Q) and 74>42 (confirmation transition, q).

In both cases, a solvent delay of 4.9 min was selected to prevent filament damage. In MS–MS (SRM) mode, argon 99.995% (Praxair) was used as collision gas at a pressure of 2.6×10^{-3} mbar in the collision cell. The application manager Targetlynx was used to process the quantitative data.

HS-SPME recommended procedure

Water samples: CAR–PDMS fiber was exposed to headspace (in a 10 mL clear glass vial) over a 5 mL water sample (20% NaCl), under magnetic stirring for 20 min at 30°C. Thermal desorption was performed at 300°C for 3 min in the GC–MS hot injector under splitless mode.

Soil samples: CAR–PDMS fiber was exposed to headspace (in a 10 mL clear glass vial) over 1 g soil wetted with 180 µL deionized water, for 20 min at 30°C. Thermal desorption was performed at 300°C for 3 min in the GC–MS hot injector under splitless mode.

Quantification was performed by using calibration standards prepared in distilled water (water analysis) or by using matrix-matched calibration prepared from an untreated soil sample (soil analysis). All standards were subjected to the overall analytical procedure, including the HS-SPME step.

Results and discussion

MS optimization

The potential of both electron-ionization (EI) and chemical ionization (CI) modes was evaluated during MS optimization. EI and CI full-scan spectra were obtained by injecting $10\ \mu\text{g mL}^{-1}$ MITC standard solutions (prepared in ethyl acetate, containing 10% acetone because of the standard preparation process) into the GC–MS–MS system (Fig. 1). The EI full-scan spectrum had two main peaks: the base peak at m/z 73, corresponding to $[\text{M}]^+$, and another less intense peak at m/z 72, corresponding to $[\text{M}-\text{H}]^+$. The CI full-scan spectrum showed only the $[\text{M}+\text{H}]^+$ ion at m/z 74.

In EI-MS–MS experiments, product-ion spectra for the precursor ion m/z 73 were obtained using collision energies in the range 5–30 eV, obtaining only one product ion at m/z 72 at the optimum value of 10 eV. To provide another transition for confirmatory purposes m/z 72 was selected as precursor ion, obtaining one product ion at m/z 45 at the optimum collision energy of 10 eV. Therefore, the transition 73>72 was selected for quantification (Q), and 72>45 for confirmation (q).

In the CI-MS–MS experiments, product-ion spectra for m/z 74 were obtained in the range 5–30 eV, obtaining two low-abundance ions at m/z 47 and 42 which were both produced at the optimum collision energy of 20 eV. Thus, 74>47 was selected as the quantification transition (Q) and 74>42 as the confirmation transition (q).

To compare the sensitivity and repeatability for both ionization modes, calibration curves (five points in the range $1\text{--}50\ \text{ng mL}^{-1}$) were obtained using standards prepared in pure ethyl acetate and injected, in triplicate, under the MS–MS conditions indicated above. The signal-to-noise ratio for CI was 2.5 times higher than for EI, but a noticeable

reduction in response was observed along the injection sequence, which resulted in bad repeatability with relative standard deviations (RSD) up to 50%. For EI, although sensitivity was slightly lower, the stability of the signal along injections led to good repeatability with RSD below 9% (no trend was observed). Thus, EI was selected for performing the next experiments.

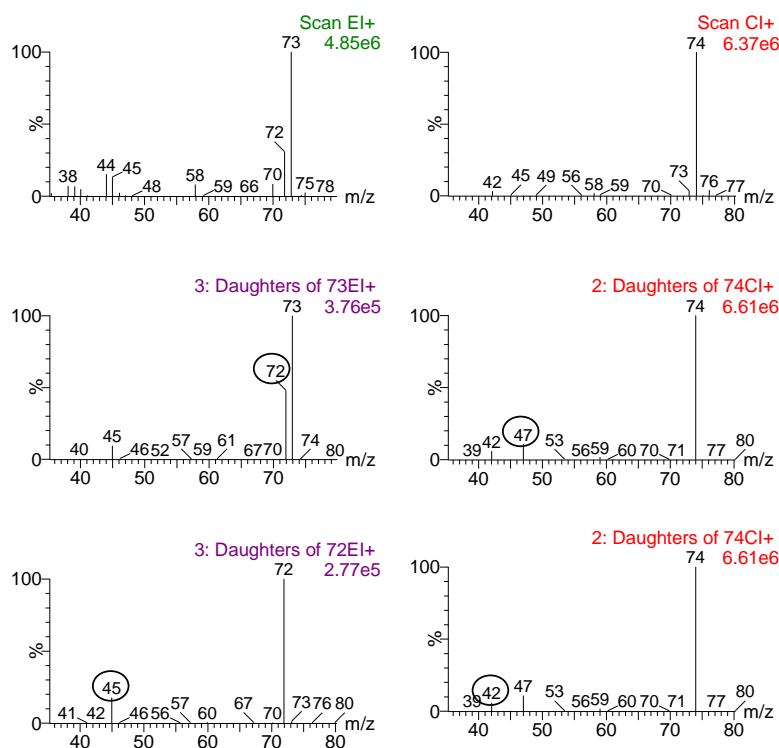


Fig. 1 Electron and chemical ionization full-scan spectra for MITC, acquired by injecting $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ standard solution (90:10 ethyl acetate:acetone) into the GC–MS–MS system (*upper*). Product-ion EI spectra for m/z 73 at 10 eV collision energy, (*center left*) and for m/z 72 at

10 eV (*bottom left*). Product-ion CI spectra for m/z 74 at 20 eV collision energy (*center and bottom right*)

HS-SPME optimization

In the first step, SPME experimental conditions were optimized using standards in distilled water, evaluating the type of fiber and the desorption and absorption steps separately.

Fiber selection

Six SPME fibers were selected for optimization: CAR–PDMS, PA, DVB–CAR–PDMS, PDMS, DVB–PDMS, and PEG. After conditioning following the manufacturers' recommendations, one extraction of 3 mL distilled water (blank) and three extractions of 3 mL standards in distilled water (50 ng mL^{-1}) were performed at 40°C over 30 min for each fiber type. Analysis of blank samples revealed neither interfering peaks nor carry over. Desorption temperature corresponded to the conditioning temperature for each fiber, and 5 min desorption time and 1 mL min^{-1} helium flow were selected.

Figure 2 shows the absolute average areas for MITC analysis by GC–MS–MS obtained with each fiber. As can be seen, fibers with carboxen in their coating provided the highest response for MITC. CAR–PDMS fiber was selected to continue the procedure optimization because of its better extraction efficiency.

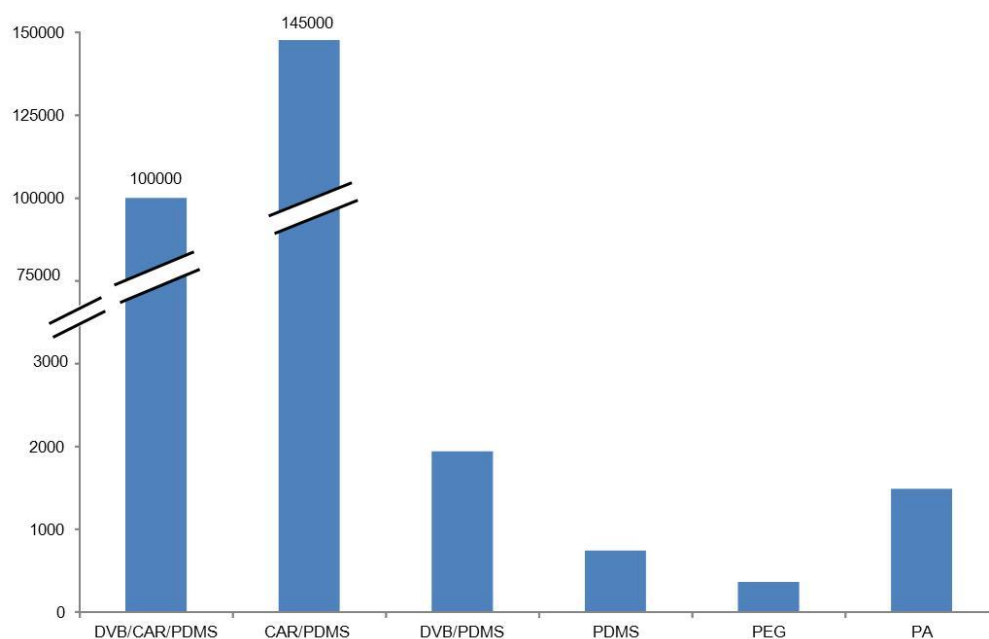


Fig. 2 Effect of SPME fiber type on extraction efficiency. Extraction conditions: 3 mL water at 50 ng mL⁻¹, using magnetic stirring, with 40°C temperature and 30 min extraction time

Desorption optimization

Once the SPME fiber was selected, the next step was to optimize desorption conditions. STATGRAPHICS Centurion XV.II was used to perform the experimental design and data treatment, with the studied variables being: temperature (290, 300, and 310°C), helium flow (1, 2, and 3 mL min⁻¹), time (1, 5, and 7 min) and fiber position in the liner (high and low, corresponding to an adjusted length of 2 cm of SPME needle for high, and 4.5 cm for low). The factorial design was half fraction with two central points, generating 10 experiments with extraction conditions of 3 mL water at a MITC concentration of 50 ng mL⁻¹, with magnetic stirring, at 40°C over 30 min.

Analysis of data generated by this design revealed that increasing temperature and flow caused an increase in MITC response (positive effect). The evaluation of fiber position in the liner revealed better results for the low position. Desorption time had a slight negative effect, because its increase caused a reduction in response, but this was not statistically significant.

The conditions finally selected were: low fiber position in the liner, 310°C, 3 min, and helium flow 3 mL min⁻¹. Figure 3a shows the Pareto chart illustrating the results obtained.

Extraction optimization

Similarly to desorption experiments, optimization of variables related to extraction was performed using a factorial design, with the exception of extraction time which was optimized independently. Experiments were performed using standards (50 ng mL⁻¹) in distilled water.

The first variables evaluated were sample volume (1, 3, and 5 mL), extraction temperature (30, 40, and 50°C), magnetic stirring (with or without), and addition of carbon disulfide (CS₂) (0, 10, and 20%). The latter was considered on the basis of the literature [43] and of our own experience, because extraction efficiency of MITC may be improved when CS₂ is added to the extraction solvent. The statistical model used was half fraction with two central points (10 experiments). Data analysis revealed that CS₂ strongly inhibited MITC extraction (on SPME fiber), presumably because it competes with the fiber in the extraction process. Thus the addition of CS₂ was discarded, and it was substituted by addition of NaCl at 0, 10, and 20%. Data analysis (Fig. 3b) indicated that an increase in temperature caused a reduction in response, probably resulting from

the negative effect of temperature on analyte adsorption onto SPME fiber and on distribution between vapor phase and fiber [44, 45]. In contrast, the response was improved by increasing sample volume and NaCl content. Magnetic stirring of the sample during extraction also had a positive effect. Although the effect of studied variables on response was not very significant, their minor effect was considered and the conditions finally selected for SPME extraction were: 5 mL sample at 30°C, containing 20% NaCl, and under magnetic stirring.

The absorption equilibrium was studied by extracting replicate samples at different times under the conditions indicated above. Initially, extraction times in the range 5–120 min were selected, but we observed that MITC response varied very little after 30 min. Thus, extraction times in the range 5–60 min were finally selected and tested in triplicate. Analyte mass absorbed into the fiber as a function of extraction time was fitted to Eq. (3) [46]:

$$n = n_o (1 - e^{-at}) \quad (3)$$

where n and n_o are the amounts of analyte absorbed at time t and at equilibrium, respectively, and a is a variable that measures how fast the absorption equilibrium can be reached in the SPME process. Fitting data for n_o and a , using Statgraphics software, enabled us to calculate t_{eq} (the time needed to extract 99% of n_o). The values calculated were 0.2882 for a and 16 min for t_{eq} . Thus, extraction equilibrium was established at 20 min. Figure 3c shows the quantity of analyte absorbed (expressed as absolute mean area of the MITC peak) into the fiber from a spiked water sample as a function of the extraction time.

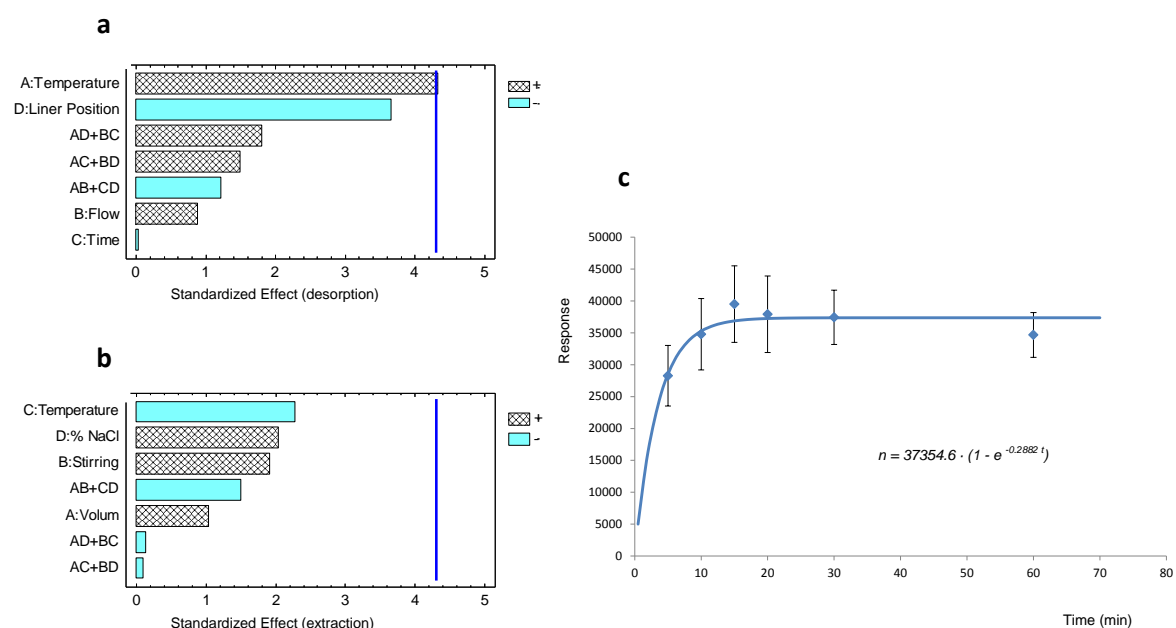


Fig. 3 (a) Pareto chart for desorption optimization for water samples.

(b) Pareto chart for extraction optimization for water samples. **(c)**

Effect of extraction time on amount extracted by HS-SPME from water samples (50 ng mL⁻¹ spiked water)

Soil extraction optimization

The next step in method development was the optimization of the determination of MITC in soil samples. An untreated soil sample (see Material and Methods) which had been previously air-dried, homogenized, and passed through a 1 mm sieve was used in these experiments. Taking into account the equilibrium time obtained in water, the extraction time in soil was initially fixed at 15 min. The statistical model used was a complete fraction with two central points. The main variables were each studied at two values: sample mass (1 and 5 g), temperature (30 and 50°C), water addition (0 and 20%),

and methanol addition (0 and 200 μL). After performing the resulting sixteen experiments, analysis of the design revealed that methanol caused a strong reduction in MITC response (similar to that observed for CS_2 addition in water samples). Moreover, increasing sample mass and extraction temperature led to a reduction in response. As indicated above, a temperature increase can produce a reduction in SPME fiber sorption; thus a compromise in extraction temperature should be reached. The effect of sample mass was somewhat surprising. The reduction in extraction efficiency might be explained by the fact that increasing the sample size from 1 g to 5 g led to an increase in the thickness of the soil layer in the extraction vial (from 3 to 15 mm), and this might affect the equilibrium from soil to headspace. Figure 4a shows the results for this design in a Pareto chart graph.

Although none of the variables had a statistically significant effect on extraction, a response surface study of temperature and percentage of water added was performed. For this purpose, three temperatures (30, 40, and 50°C) and three water percentages (10, 20, and 30%) were selected. Results for temperature confirmed the trend observed in previous experiments. In relation to the addition of water, it seemed that the presence of some water in soil, without exceeding soil moisture capacity, improved the extraction of MITC, probably through displacement of MITC from soil pores. A compromise value of approximately 20% water was selected (180 μL water added onto 1 g soil) (Fig. 4b). The optimum conditions finally selected for MITC extraction in soil were: 1 g soil, addition of 180 μL water, 20 min extraction time, and 30°C.

The absorption equilibrium was studied for extraction times in the range 5–60 min, which were tested in triplicate. Fitting data for n_o and a , using Statgraphics software, enabled us to calculate t_{eq} (the time needed to extract 99% of n_o). The values calculated

were 0.2318 for α and 19.8 min for t_{eq} . Thus, optimum extraction time was again established to be 20 min. Figure 4c shows the quantity of analyte absorbed into the fiber (expressed as absolute mean area of the MITC peak) from a spiked soil sample as a function of the extraction time.

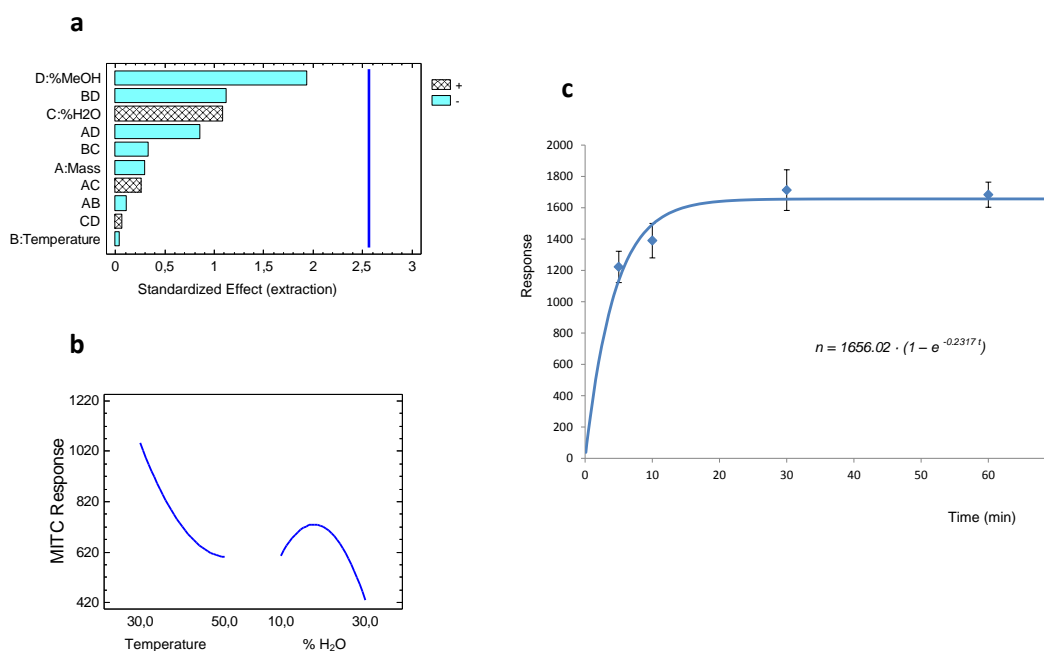


Fig. 4 (a) Pareto chart for extraction optimization for soil. **(b)** Results for response surface study of temperature and % H₂O. **(c)** Effect of extraction time on amount extracted by HS-SPME from soil samples (5 ng g⁻¹ spiked soil)

Application of MHS-SPME to soil samples

Once the extraction procedure had been optimized, the applicability of HS-SPME was tested, and the problem of sample quantification was studied. The possibility of using M-SPME, using an approach that had already been tested by our group for determination of volatile compounds [39], was evaluated to this end. First, β was empirically determined for five consecutive extractions from vials containing 1 g soil fortified at 5 and 50 ng g⁻¹ (in duplicate). Fitting experimental data to Eq. (2), the mean β value was 0.33. To evaluate the feasibility of quantification using external solvent calibration, total peak area (A_T) was calculated by Eq. (1), using single-extraction peak area and the calculated β . Quantification was performed by interpolation of A_T in the calibration curve obtained by injection of 1 μ L pure-solvent standards. Recovery obtained was 34%, which made MHS-SPME unsuitable for quantification purposes. This is in agreement with the literature [39, 41], which reports that β values below 0.4 make MHS-SPME unfeasible because most of the analyte is isolated in the first extraction. Under these conditions, use of MHS-SPME would lead to underestimation of MITC in the samples, and therefore quantification using matrix-matched calibration was required, despite it being more tedious and time consuming.

Method validation

The HS-SPME-GC–MS–MS method developed for water and soil was validated in terms of linearity, precision, accuracy, limit of quantification (LOQ), limit of detection (LOD), and specificity.

Linearity was studied for a calibration curve (three replicates) prepared by fortifying distilled water or untreated blank soil (obtained from an experimental site in Toledo, Spain) at seven concentrations, in the range 0.026–2.6 ng mL⁻¹ for water and 1–100 ng g⁻¹ for soil. In both cases the HS-SPME procedure had linear behavior in the range tested, with r^2 values above 0.999 and residuals below 30%, and revealing no trend.

Accuracy was estimated by means of recovery experiments using untreated blank samples (of different origin from the samples used for matrix-matched calibration) fortified with MITC ($n=5$) at two concentrations: 0.1 and 1 ng mL⁻¹ for groundwater, and 4 and 40 ng g⁻¹ for soil. Water and soil samples used for recovery experiments were collected from a well and an experimental field, respectively, both located in the Castellon province. Homogenized air-dried soil samples were fortified with 20 µL of the appropriate standard in acetone and allowed to stand for 1 h in a closed vial before extraction; they were then subjected to the recommended procedure. Satisfactory results were obtained for both soil and water, with recoveries above 76%. Precision, expressed as repeatability, was calculated from recovery experiments ($n=5$) at each fortification level. Relative standard deviations (RSD) were lower than 7% for both types of sample, even at the lowest fortification level. It is noteworthy that satisfactory results were obtained for soil, a complex-matrix sample that makes the application of matrix-matched standards calibration problematic because of the variability in composition and the different types of soil that may be the subject of analysis. In this work, we performed

matrix-matched calibration with an untreated soil (from Toledo experimental field) different from that used for recovery experiments (from Castellon field), trying to simulate real scenarios where different types of soil must be analyzed in the laboratory. In addition, when analyzing the two real-soil samples included in this study (see next section “Analysis of soils”) two quality controls (QCs) were analyzed, consisting of untreated soils fortified at two concentrations, and the recoveries obtained were satisfactory (in the range 83–99%) despite the matrix-matched calibration having been made with the soil from Toledo field.

The LOQ and LOD were calculated as the concentrations corresponding to a signal-to-noise ratio of 10 and 3, respectively, from the chromatogram corresponding to the lowest point of the matrix-matched calibration. In water, the LOQ and LOD were 0.05 ng mL⁻¹ and 0.017 ng mL⁻¹, respectively, whereas in soil they were 0.34 ng g⁻¹ and 0.1 ng g⁻¹, respectively. The LOQ and LOD resulting from the application of HS-SPME-GC-MS-MS made the method appropriate for monitoring MITC in this type of sample, according to the requirements of the SANCO/825 guideline [13]. The use of mass spectrometry in SRM gives high sensitivity and specificity to the method, with LOQ and LOD better than those of previous sensitive methods that reported LOD of 1 ng g⁻¹ [38].

The ability of the analytical method to provide a selective measurement for the analyte was evaluated by analyzing a procedure blank, a blank sample, and a blank sample spiked at the low validation level. No interfering peaks were found at MITC retention time in any of the transitions used (Q and q), proving the specificity of the method.

Table 1 shows the validation results for MITC determination in water and soil. Figure 5 shows illustrative chromatograms corresponding to soil and water samples (blank and

fortified at the low validation level) and to the matrix-matched calibration point equivalent to this level.

Table 1. Validation results for water and soil samples ($n=5$).

	WATER SAMPLES		SOIL SAMPLES	
	0.1 ng/mL	1 ng/mL	4 ng/g	40 ng/g
<i>Recovery (%)</i>	79	83	76	92
<i>Precision (RSD %)</i>	6	4	7	7
<i>LOQ</i>	0.05 ng/mL		0.34 ng/g	
<i>LOD</i>	0.017 ng/mL		0.10 ng/g	

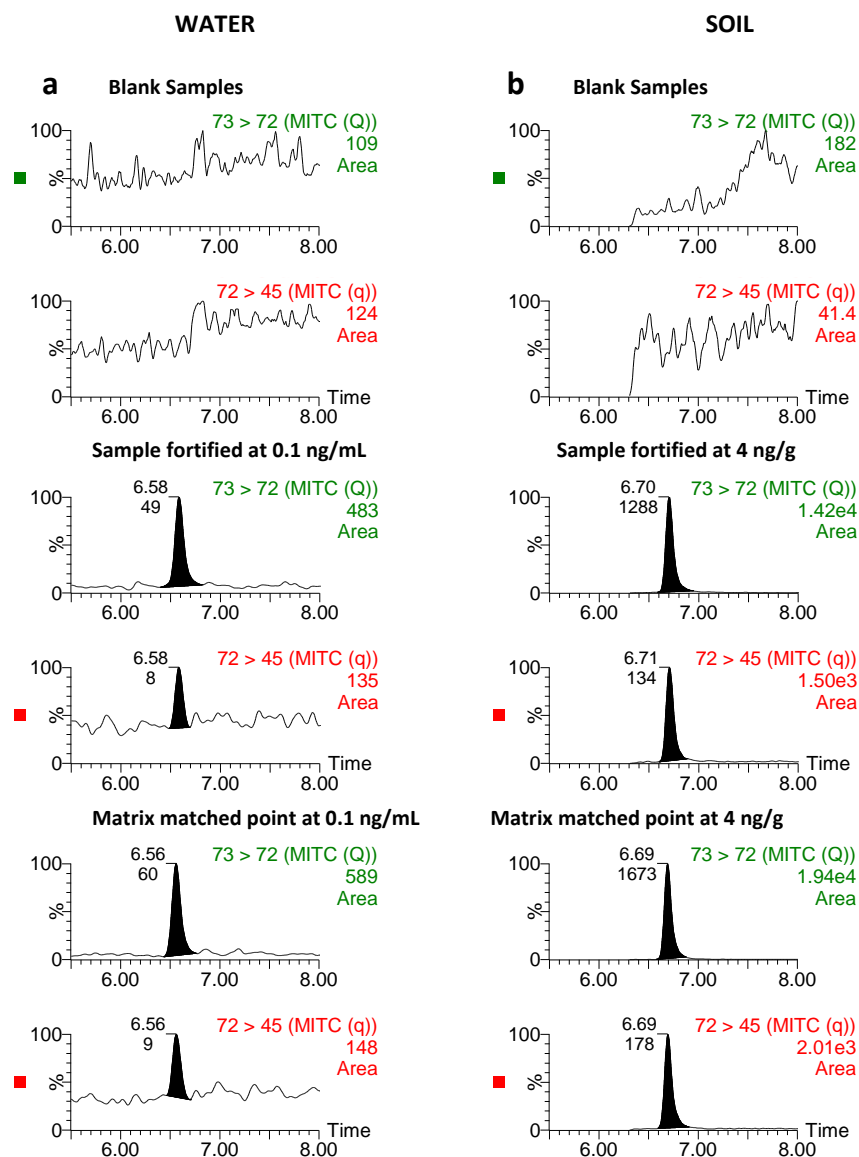


Fig. 5 Representative GC–MS– MS chromatograms (including both Q and q transitions). **(a)** Water: blank sample, sample fortified at 0.1 ng mL⁻¹, and matrix-matched calibration standard at 0.1 ng mL⁻¹. **(b)** Soil: blank sample, sample fortified at 4 ng g⁻¹, and matrix-matched calibration standard at 4 ng g⁻¹

Analysis of soils

The HS-SPME procedure developed for soils was applied to samples collected from two experimental plots that had been treated with metam sodium. Analyses of the samples were performed (in quintuplicate) before and after air-drying the soil for 48 hours to evaluate potential volatilization losses, because there is no general consensus on the appropriateness of applying this step in analyses [47, 48].

Quantification of samples was performed using matrix-matched calibration (five points in the range 1–100 ng g⁻¹) by extracting an untreated soil sample fortified at the corresponding concentrations. In addition, two QCs were introduced to each sample batch at the validated levels (4 and 40 ng g⁻¹). Recoveries for the four QCs analyzed were satisfactory, and varied from 83 to 99%.

Soil sample 1 corresponded to a greenhouse soil to which metam sodium had been applied 20 days before sampling. In this case, MITC was detected at a very low concentration. A small peak was observed for the quantification transition (Q), although it could not be confirmed because of the absence of a chromatographic peak at the (less sensitive) confirmation transition.

Soil sample 2 corresponded to an open-air plot into which metam sodium was injected, after which the soil was tamped. Samples were taken immediately after metam sodium application. In this case, MITC residues were found in both wet and dry soil at mean concentrations ($n=5$) of 2.38 and 1.43 ng g⁻¹, respectively (Fig. 6). These values revealed that the concentration of MTIC decreased by 40% after air drying, as might be expected for this volatile analyte [44, 45]. A paired *t*-test revealed a significant difference

between the results obtained from dry and wet samples (p -value 0.0094 at 95% confidence level).

For confirmation of the MITC identity in positive samples, the Q/q ratio, defined as the ratio between the intensity of peaks for quantification transition (Q) and confirmation transition (q), was used as the confirmation variable. The theoretical Q/q ratio was calculated as the mean value for matrix-matched standards. The experimental Q/q ratio in positive samples should fit this value, with a maximum deviation of $\pm 30\%$ [49]. For the five replicates of the positive sample the average Q/q deviation was 2%, revealing good agreement with the theoretical values; thus SANCO guideline requirements were fulfilled (Fig. 6).

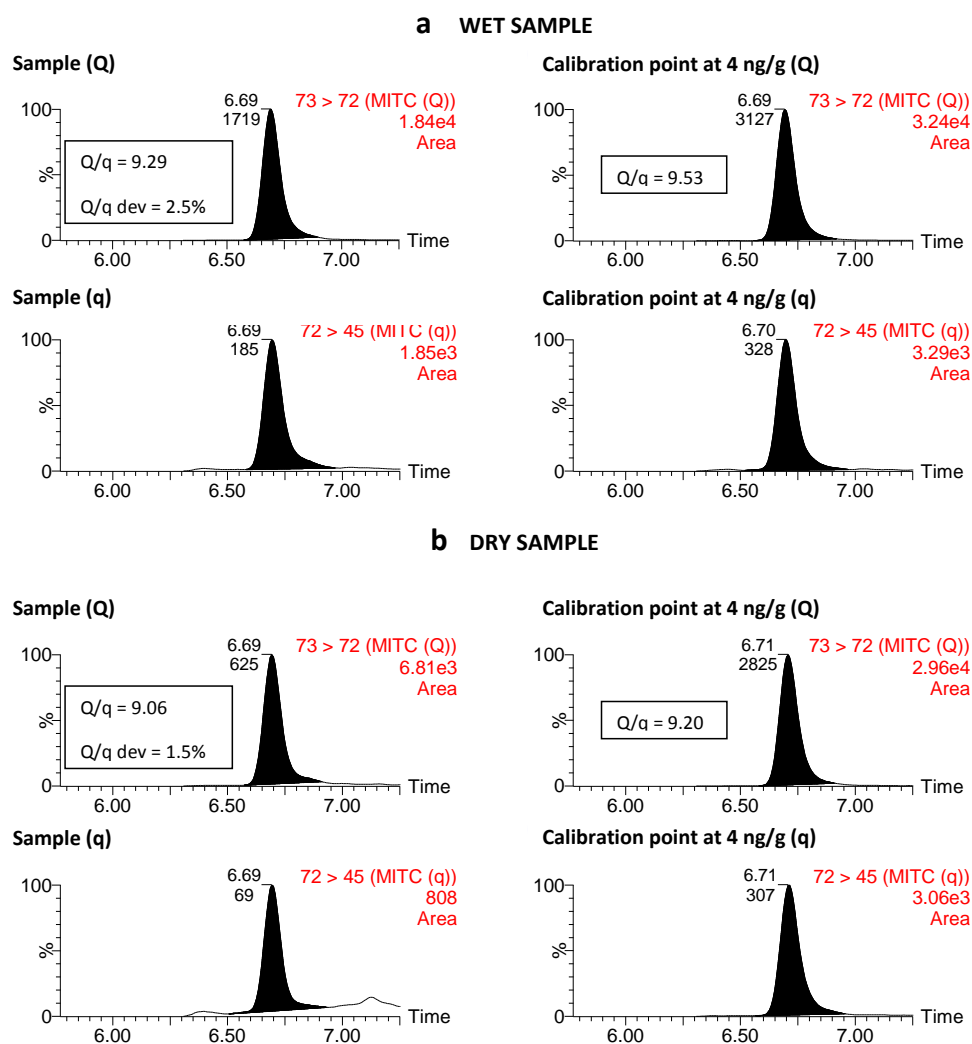


Fig. 6 GC–MS–MS chromatograms for quantification (Q) and confirmation (q) transitions for soil sample 2 (metam sodium injection): **(a)** wet sample (2.38 ng g^{-1}) (*left*) and matrix-matched calibration standard at 4 ng g^{-1} (*right*). **(b)** Dry sample (1.43 ng g^{-1}) (*left*) and matrix-matched calibration standard at 4 ng g^{-1} (*right*). Q/q ratios and deviations from matrix-matched standards are also shown in the chromatograms

Conclusions

HS-SPME has proved to be a useful approach for extraction of MITC in water and soil samples. In combination with GC–MS–MS (QqQ) it provides very low limits of detection and quantification, appropriate for monitoring the application of metam sodium to soil at very low concentrations. In addition to the excellent sensitivity, the use of GC–MS–MS with acquisition of two SRM transitions also provides high reliability for the identification of MITC in samples.

The optimized method was applied to analysis of soil samples from two experimental plots to which metam sodium had been applied. MITC was found at a 2.38 ng g⁻¹ concentration, revealing the application of its precursor metam sodium to the soil. Air drying (for 48 h) of the soil sample before analysis led to a 40% decrease in MITC concentration, because of the volatility of MITC. Consequently, analysis of wet soil samples is recommended to avoid potential losses of the analyte.

Acknowledgments The authors acknowledge the support of Generalitat Valenciana, as research group of excellence (Prometeo 2009/054). The support and advice of J. V. Sancho in MS optimization are greatly appreciated. The authors also acknowledge the cooperation of SynTech Research Spain in soil sampling and characterization.

References

1. Gan J, Papiernik S, Yates S, Jury W (1999) Temperature and moisture effects on fumigant degradation in soil. *J Environ Qual* 28:1436–1441
2. Dungan R, Gan J, Yates S (2003) Accelerated degradation of methyl isothiocyanate in soil. *Water Air Soil Pollut* 142:299–310
3. Smelt J, Leistra M (1974) Conversion of metham-sodium to methyl isothiocyanate and basic data on behavior of methyl isothiocyanate in soil. *Pestic Sci* 5:401–407
4. Saeed I, Rouse D, Harkin J (2000) Methyl isothiocyanate volatilization from fields treated with metam-sodium. *Pest Manag Sci* 56:813–817
5. Bretaudeau Deguigne M, Lagarce L, Boels D, Harry P (2011) Metam sodium intoxication: the specific role of degradation products—methyl isothiocyanate and carbon disulphide—as a function of exposure. *Clin Toxicol* 49:416–422
6. Zheng W, Yates SR, Papiernik SK, Nunez J (2006) Conversion of metam sodium and emission of fumigant from soil columns. *Atmos Environ* 40:7046–7056
7. Ou L, Thomas J, Allen L, Vu J, Dickson D (2006) Effects of application methods of metam sodium and plastic covers on horizontal and vertical distributions of methyl isothiocyanate in bedded field plots. *Arch Environ Contam Toxicol* 51:164–173
8. Simpson CR, Nelson SD, Stratmann JE, Ajwa HA (2010) Surface water seal application to minimize volatilization loss of methyl isothiocyanate from soil columns. *Pest Manag Sci* 66:686–692

9. Wang D, Juzwik J, Fraedrich SW, Spokas K, Zhang Y, Koskinen WC (2005) Atmospheric emissions of methyl isothiocyanate and chloropicrin following soil fumigation and surface containment treatment in bare-root forest nurseries. *Can J For Res* 35:1202–1212
10. Little MH, Lepage J, Sullivan DA, Hebert VR (2013) Comparison of field methyl isothiocyanate flux following Pacific Northwest surface-applied and ground-incorporated fumigation practices. *Pest Manag Sci* 69:620–626
11. LAISOL. Desinfectante de suelos (2013). <http://www.lainco.es/files/pdf/9132%20LAISOL.pdf>
12. Pesticide Action Network Europe (2011) Essential use soil fumigant Metam Sodium 1–20. <http://www.pan-europe.info/Resources/Reports/PAN-report%20on%20essential%20use%20of%20Metam.pdf>
13. European Commission Directorate General Health and Consumer Protection (2010) Guidance document on pesticide residue analytical methods. Document N° SANCO/825/00 rev.8.1
14. Candole BL, Csinos AS, Wang D (2007) Concentrations in soil and efficacy of drip-applied 1,3-D plus chloropicrin and metam sodium in plastic-mulched sandy soil beds. *Crop Prot* 26:1801–1809
15. Zhang Y, Spokas K, Wang D (2005) Degradation of methyl isothiocyanate and chloropicrin in forest nursery soils. *J Environ Qual* 34: 1566–1572

16. Zheng W, Yates SR, Guo MX, Papiernik SK, Kim JH (2004) Transformation of chloropicrin and 1,3-dichloropropene by metam sodium in a combined application of fumigants. *J Agric Food Chem* 52:3002–3009
17. Stiles CL, Sams CE, Robinson DK, Coffey DL, Mueller TC (2000) Influence of metam sodium on the dissipation and residual biological activity of the herbicides EPTC and pebulate in surface soil under black plastic mulch. *J Agric Food Chem* 48: 4681–4686
18. Beltran J, Lopez FJ, Hernandez F (2000) Solid-phase microextraction in pesticide residue analysis. *J Chromatogr A* 885:389–404
19. Mee Kin C, Guan Huat T (2010) Headspace solid-phase microextraction for the evaluation of pesticide residue contents in cucumber and strawberry after washing treatment. *Food Chem* 123: 760–764
20. Chai MK, Tan GH (2009) Validation of a headspace solid-phase microextraction procedure with gas chromatography-electron capture detection of pesticide residues in fruits and vegetables. *Food Chem* 117:561–567
21. Sang Z, Wang Y, Tsoi Y, Leung KS (2013) CODEX-compliant eleven organophosphorus pesticides screening in multiple commodities using headspace-solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Food Chem* 136:710–717
22. Tsoutsi C, Konstantinou I, Hela D, Albanis T (2006) Screening method for organophosphorus insecticides and their metabolites in olive oil samples based on headspace solid-phase microextraction coupled with gas chromatography. *Anal Chim Acta* 573–574:216– 222

23. Lambropoulou DA, Albanis TA (2002) Headspace solid phase microextraction applied to the analysis of organophosphorus insecticides in strawberry and cherry juices. *J Agric Food Chem* 50:3359– 3365
24. Durovic RD, Dordevic TM (2012) Effects of soil composition on solid phase microextraction determination of triazine and organophosphorus pesticides. *J Environ Sci Health Part B Pestic Food Contam Agric Wastes* 47:851–857
25. Carvalho PN, Rodrigues PNR, Alves F et al (2008) An expeditious method for the determination of organochlorine pesticides residues in estuarine sediments using microwave assisted pre-extraction and automated headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta* 76: 1124–1129
26. Chai X, Jia J, Sun T, Wang Y, Liao L (2007) Application of a novel cold activated carbon fiber-solid phase microextraction for analysis of organochlorine pesticides in soil. *J Environ Sci Health B Pestic Contam Agric Wastes* 42:629–634
27. Herbert P, Morais S, Paíga P, Alves A, Santos L (2006) Development and validation of a novel method for the analysis of chlorinated pesticides in soils using microwave-assisted extraction-headspace solid phase microextraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 384:810–816
28. Navalón A, Prieto A, Araujo L, Vílchez JL (2004) Determination of pyrimethanil and kresoxim-methyl in soils by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 379:1100–1105

29. Navalon A, Prieto A, Araujo L, Vilchez JL (2002) Determination of oxadiazon residues by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 946:239–245
30. Doong RA, Liao PL (2001) Determination of organochlorine pesticides and their metabolites in soil samples using headspace solid-phase microextraction. *J Chromatogr A* 918:177–188
31. Sakamoto M, Tsutsumi T (2004) Applicability of headspace solid-phase microextraction to the determination of multi-class pesticides in waters. *J Chromatogr A* 1028:63–74
32. Li HP, Li GC, Jen JF (2003) Determination of organochlorine pesticides in water using microwave assisted headspace solid-phase microextraction and gas chromatography. *J Chromatogr A* 1012:129–137
33. Lambropoulou DA, Albanis TA (2001) Optimization of headspace solid-phase microextraction conditions for the determination of organophosphorus insecticides in natural waters. *J Chromatogr A* 922:243–255
34. Di Primo P, Gamliel A, Austerweil M, Steiner B, Beniches M, Peretz-Alon I, Katan J (2003) Accelerated degradation of metam-sodium and dazomet in soil: characterization and consequences for pathogen control. *Crop Prot* 22:635–646
35. Triky-Dotan S, Austerweil M, Steiner B, Peretz-Alon Y, Katan J, Gamliel A (2009) Accelerated degradation of metam-sodium in soil and consequences for root-disease management. *Phytopathology* 99:362–368

-
36. Triky-Dotan S, Austerweil M, Steiner B, Peretz-Alon Y, Katan J, Gamliel A (2007) Generation and dissipation of methyl isothiocyanate in soils following metam sodium fumigation: impact on verticillium control and potato yield. *Plant Dis* 91:497–503
 37. Sanon A, Garba M, Auger J, Huignard J (2002) Analysis of the insecticidal activity of methylisothiocyanate on *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) and its parasitoid *Dinarmus basalis* (Rondani) (Hymenoptera: Pteromalidae). *J Stored Prod Res* 38:129–138
 38. Fuster S, Beltran J, López FJ, Hernández F (2005) Application of solid phase microextraction for the determination of soil fumigants in water and soil samples. *J Sep Sci* 28:98–103
 39. Serrano E, Beltran J, Hernandez F (2009) Application of multiple headspace-solid-phase microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry to quantitative analysis of tomato aroma components. *J Chromatogr A* 1216:127–133
 40. Ezquerro O, Ortiz G, Pons B, Tena M (2004) Determination of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in soils by multiple headspace solid-phase microextraction. *J Chromatogr A* 1035:17–22
 41. Tena MT, Carrillo JD (2007) Multiple solid-phase microextraction: theory and applications. *TrAc Trends Anal Chem* 26:206–214
 42. Hernandez F, Cervera MI, Portoles T, Beltran J, Pitarch E (2013) The role of GC–MS–MS with triple quadrupole in pesticide residue analysis in food and the environment. *Anal Methods* 5:5875–5894
-

43. Woodrow JE, Seiber JN, LeNoir JS, Krieger RI (2008) Determination of methyl isothiocyanate in air downwind of fields treated with metam-sodium by subsurface drip irrigation. *J Agric Food Chem* 56:7373–7378
44. Pawliszyn J (1997) Solid phase microextraction: theory and practice. Wiley-VCH, Inc., USA
45. Pawliszyn J (2007) Handbook of solid phase microextraction. University of Waterloo, Ontario. Ed. Janusz Pawlyszyn
46. Ai J (1997) Headspace solid phase microextraction. Dynamics and quantitative analysis before reaching a partition equilibrium. *Anal Chem* 69:3260–3266
47. Barcelo D (1993) Extraction, clean-up and recoveries of persistent trace organic contaminants from sediment and biota samples. *Environ. Anal. Tech. Appl. Qual. Assur.* Elsevier Science Publishers B.V
48. Theocharopoulos SP, Wagner G, Sprengart J, Mohr ME, Desaulles A, Muntau H, Christou M, Quevauviller P (2001) European soil sampling guidelines for soil pollution studies. *Sci Total Environ* 264:51–62
49. European Commission Directorate General Health and Consumer Protection (2013) Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed. Document N° SANCO/12571/2013

3.2.3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Optimización de las condiciones MS/MS

En primer lugar, se realizó la inyección de una disolución patrón de MITC en el sistema GC-MS/MS utilizando las fuentes de ionización de EI y CI, con la finalidad de seleccionar la más adecuada para el método. Los iones precursores seleccionados fueron m/z 73 y 72 para EI, correspondientes a $[M]^+$ y $[M-H]^+$, respectivamente, y m/z 74 para CI, correspondiente a $[M+H]^+$. Las experiencias de fragmentación realizadas a distintas energías de colisión permitieron obtener las transiciones: $73 > 72$ (Q) y $72 > 45$ (q) en el caso de EI, y $74 > 47$ (Q) y $74 > 42$ (q) para CI. En ambos casos, se aseguraba la adquisición de dos transiciones para llevar a cabo la confirmación de positivos en muestras. La *Figura 1 del artículo científico 3* muestra los espectros obtenidos en modo *full-scan* que permitieron la selección de iones precursores. También se incluyen en la *Figura 1*, los espectros obtenidos en modo *product-ion scan*, para la selección de los iones productos más adecuados en cada modo de ionización.

Una vez definidas las condiciones de medida MS/MS para las dos fuentes de ionización, se realizó una comparación entre ambos modos de trabajo en lo referente a sensibilidad y repetibilidad. Para ello, se inyectó un calibrado en solvente por triplicado (5 puntos), aplicando las condiciones MS/MS seleccionadas para cada fuente de ionización. Los resultados mostraron que, en términos de sensibilidad, la fuente CI presentó una relación S/N mayor (x 2.5) que la fuente EI, pero la respuesta fue disminuyendo a lo largo de la secuencia de inyección, resultando una elevada desviación estándar, lo que se tradujo en una baja robustez. Teniendo en cuenta estos resultados, se decidió seleccionar la fuente EI para continuar con las experiencias. La *Figura 3.3* muestra las curvas ajustadas para la respuesta media de los tres calibrados en solvente

inyectados junto con las barras de error calculadas a partir de la desviación estándar de cada punto.

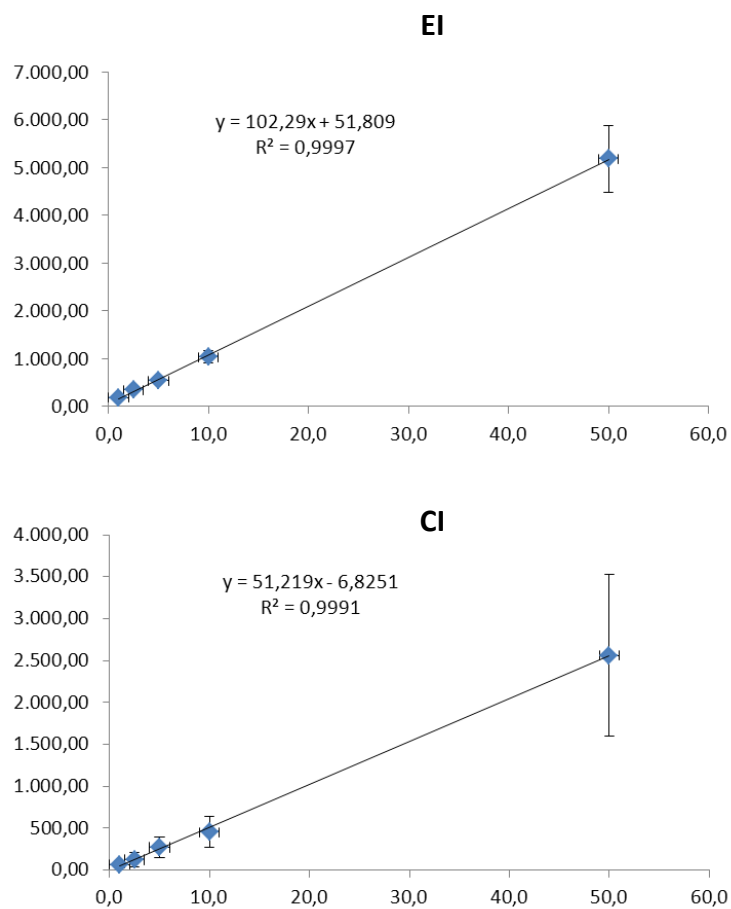


Figura 3.3. Curvas de calibrado obtenidas a partir de la inyección de tres calibrados en solvente de MITC (n=3) utilizando las fuentes de ionización EI y CI.

Optimización de HS-SPME

Para la optimización del procedimiento HS-SPME se evaluaron los siguientes aspectos: fase estacionaria de la fibra, optimización de la desorción en el inyector del GC y optimización de la extracción en agua y suelo. El programa informático utilizado para realizar el diseño experimental en la optimización de las etapas de desorción y extracción fue el STATGRAPHICS Centurion XV.II.

Todas las experiencias (excepto la optimización de la extracción en muestras de suelo) se realizaron con agua destilada fortificada a 50 ng/mL. Para la elección de la fibra se evaluaron varias fases estacionarias realizando la extracción del MITC por triplicado. Los resultados demostraron que las fibras que tenían Carboxen en su fase estacionaria presentaban mayor capacidad de extracción del MITC. Así pues, la fibra seleccionada fue la CAR-PDMS. La *Figura 2 del artículo científico 3*, muestra el efecto de la fase estacionaria de las fibras sobre la eficiencia en la extracción del MITC (alrededor de 50 veces más señal con las fibras que contienen Carboxen).

Las condiciones de desorción se seleccionaron en función de los resultados obtenidos en las experiencias de optimización basadas en un diseño experimental utilizando el programa STATGRAPHICS. La *Figura 3a del artículo científico 3* muestra el diagrama de Pareto de estos resultados, de modo que las condiciones fijadas fueron: temperatura 310°C (efecto +), tiempo 3 min (efecto -, poco significativo), flujo de He 3 mL/min (efecto +, poco significativo) y posición “baja” de la fibra en el liner (efecto -). Siguiendo un esquema similar de trabajo, se llevó a cabo la optimización de la extracción en muestras de agua. Cabe destacar el efecto negativo que supuso la adición de CS₂ en la extracción, ya que se observó que aquellas experiencias en las que se añadía CS₂ a las muestras mostraban una total ausencia de respuesta cromatográfica de MITC. Esta

variable (adición de CS_2) se consideró en base a resultados descritos en la literatura (Woodrow, 2008), así como nuestra experiencia en un estudio de exposición realizado bajo los principios de las BPL en donde se observó que el MITC se retenía en cartuchos de carbono y que la adición de CS_2 al disolvente usado para la elución mejoraba la eficiencia de la misma. Sin embargo, en el presente trabajo, basado en el uso de HS-SPME, no se observó ningún efecto beneficioso al añadir CS_2 , por lo cual se descartó su uso y se repitieron las experiencias añadiendo NaCl. La *Figura 3b del artículo científico 3* muestra el diagrama de Pareto del efecto de las variables sobre la extracción. Entre los resultados cabe destacar el efecto negativo que supone el aumento de la temperatura sobre la adsorción del MITC en la fibra, probablemente debido a que modifica la distribución entre la fase vapor y la propia fibra (Pawliszyn, 1997; Pawliszyn 2007). Las condiciones finales seleccionadas fueron: 5 mL de muestra (efecto +), temperatura 30°C (efecto -), 20% NaCl (efecto +) y agitación magnética (efecto +). En la última etapa, se procedió al estudio del tiempo de extracción en experiencias en las que se obtuvo la respuesta cromatográfica frente al tiempo de extracción. De este modo, se pudo calcular los valores experimentales para α y t_{eq} mediante un ajuste matemático no lineal, siendo α un parámetro que indica la rapidez con la que se alcanza el equilibrio y el t_{eq} el tiempo necesario para extraer el 99% de la masa de analito en condiciones de equilibrio. Los valores calculados fueron 0.2882 y 16 min, respectivamente. Finalmente, se estableció como tiempo de extracción 20 min para realizar la validación del método. En la *Figura 3c del artículo científico 3* puede verse la curva ajustada para el cálculo de las variables de equilibrio en agua.

Para la optimización del procedimiento de extracción en suelos, siguiendo el mismo esquema que en el caso de las aguas, se desarrolló un diseño experimental con las variables a estudiar y, mediante el programa Statgraphics, se representaron los

resultados en un diagrama de Pareto. Los resultados pusieron de manifiesto un efecto negativo de la adición de MeOH, de forma similar a lo observado con la adición de CS₂ en muestras de agua. En este caso no se consideró necesario repetir las experiencias, pues el modelo estadístico seleccionado fue de fracción completa y los datos obtenidos proporcionaban suficiente información. De nuevo, se observó un efecto negativo de la temperatura sobre la extracción, y también un efecto negativo del aumento de la masa de suelo en la extracción. Este hecho podría deberse al aumento en el espesor de la muestra de suelo en el vial, que dificultaría el equilibrio entre el suelo y la fase vapor. Para establecer las condiciones finales, de forma adicional se realizó el estudio de la superficie de respuesta para las variables temperatura y porcentaje de H₂O. Las *Figuras 4a y 4b del artículo científico 3* muestran el diagrama de Pareto y la representación de la superficie de respuesta, que confirmó el efecto negativo de la temperatura y el efecto positivo de la adición de agua sin rebasar la capacidad del suelo. Las condiciones finales fijadas fueron: 1g suelo, tiempo 20 min, temperatura 30°C y adición de 180 µL de H₂O. Finalmente, se realizó el estudio del tiempo de equilibrio con las condiciones óptimas mediante un ajuste matemático no lineal, siendo a y el t_{eq} los parámetros definidos anteriormente en el caso de agua. Los valores experimentales obtenidos fueron 0.2318 y 19.8 min, para a y t_{eq} respectivamente, ligeramente superiores a los calculados para agua. Así, para llevar a cabo las experiencias de validación se seleccionó como tiempo de extracción 20 min. En la *Figura 4c del artículo científico 3*, puede verse la curva ajustada para el estudio de las condiciones de equilibrio.

Tal y como se ha mencionado en el Capítulo 1, la cuantificación en análisis basados en HS-SPME resulta compleja y más aún en el caso de muestras medioambientales, por lo que se realizó un estudio sobre la posibilidad de utilizar la aproximación de MHS-SPME, que permite el cálculo del área total estimada del analito

mediante la determinación del parámetro experimental β y una extracción simple sobre la muestra (ecuación 2 del Capítulo 1):

$$A_T = A_1 / (1-\beta)$$

Para conocer el valor de β , se realiza el ajuste mediante regresión lineal de los logaritmos de las áreas individuales obtenidas en cada extracción sucesiva frente a $i-1$, siendo i el número de la extracción (ecuación 3 del Capítulo 1):

$$\log A_i = (i-1) \log \beta + \log A_1$$

Los cálculos del parámetro experimental β se realizaron a dos niveles de concentración (5 y 50 ng/g) por duplicado, obteniéndose un valor medio de 0.33. La Figura 3.4 muestra las curvas ajustadas que se obtuvieron para las dos concentraciones estudiadas.

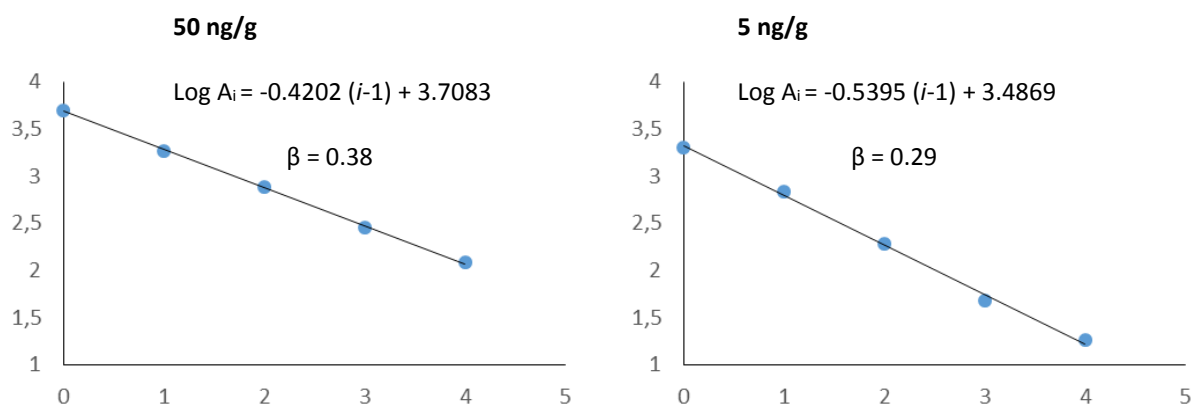


Figura 3.4. Ajuste mediante regresión lineal del logaritmo de A_i (área obtenida en la extracción i) frente a $(i-1)$. (Izda) correspondiente a 50 ng/g. (Dcha) correspondiente a 5 ng/g

Las experiencias de recuperación utilizando calibración en solvente, se realizaron a dos niveles de concentración sobre la muestra de suelo, 4 y 40 ng/g, y se obtuvieron recuperaciones del orden del 30%. A fin de mejorar estos resultados, se diseñaron varias estrategias destinadas a evaluar si las bajas recuperaciones se debían a un efecto matriz. La primera incluía el uso de un patrón interno (salicilato de metilo-D₃), el cual no resultó adecuado porque su respuesta cromatográfica aumentaba en las sucesivas extracciones. A continuación, se disminuyó la masa del suelo de 1 a 0.1 g, pero el valor de β calculado fue 0.3 y las recuperaciones no mejoraron. Finalmente, se realizó la prueba sin suelo, en un vial que únicamente contenía 150 μ L de H₂O y 20 μ L de MITC 200 ng/mL, y los resultados fueron los mismos que cuando el suelo está presente, β aproximadamente 0.3 y recuperaciones bajas. Así pues, se confirmó que, tal y como describe la bibliografía (Serrano, 2009; Tena, 2007), cuando β es inferior a 0.4 la cuantificación utilizando MHS-SPME y calibración externa en solvente no es adecuada, porque la mayor parte del analito se aísla tras la primera extracción. En consecuencia, se descartó la posibilidad de aplicar la aproximación MHS-SPME, y la cuantificación se realizó utilizando calibración en matriz, lo que implicó un aumento del tiempo de análisis y una mayor complejidad del método, aunque los resultados obtenidos fueron satisfactorios, tal como se muestra a continuación.

Validación y análisis de muestras

Siendo conocida la variabilidad de las matrices ambientales, los ensayos de validación se realizaron utilizando muestras de diferente origen, tanto para preparar las muestras fortificadas en el caso de los ensayos de recuperación, como para las muestras blanco destinadas a la preparación del calibrado en matriz, tratando así de simular escenarios reales y demostrar la fiabilidad y robustez del método.

La metodología HS-SPME desarrollada se validó a dos niveles de concentración, 0.1 y 1 ng/mL en agua y 4 y 40 ng/g en suelo, mediante la extracción de 5 réplicas de muestras fortificadas para cada nivel y posterior cuantificación con calibración en matriz. Los resultados obtenidos respecto a linealidad, exactitud y precisión fueron muy satisfactorios (recuperaciones 76-92% y $RSD \leq 7\%$), y los LOQ y LOD calculados pusieron de manifiesto la elevada sensibilidad alcanzada. La *Tabla 1 del artículo científico 3* muestra un resumen de los resultados de estas experiencias. Hasta la fecha, no se había combinado el potencial de la técnica HS-SPME y GC-MS/MS en la determinación de MITC en muestras de suelo; por este motivo, la sensibilidad alcanzada en este método superó con creces la reportada en anteriores publicaciones (Fuster, 2005).

Finalmente, para comprobar la aplicabilidad del método se analizaron dos muestras de suelo procedentes de parcelas experimentales en las que se había aplicado metam sodio. Una de ellas correspondía a un invernadero en el que la aplicación se había realizado 20 días antes de la toma de muestra, y había permanecido tapado con plástico hasta la fecha de muestreo. La otra muestra se tomó tras realizar la inyección de metam sodio en el suelo y posterior compactado del mismo, a fin de evitar la emisión de MITC a la atmósfera. Al tratarse de un compuesto volátil, se pensó realizar el análisis obviando la etapa de secado del suelo, pero teniendo en cuenta que existe controversia

respecto a si los suelos deben secarse o no antes de su análisis (Barceló, 1993; Theocharopoulos, 2001), finalmente también se realizó el análisis tras ser secado a temperatura ambiente durante 48 horas, con el fin de estimar si estadísticamente existían diferencias significativas. En la muestra sin secar procedente del invernadero, se detectó MITC a muy baja concentración, aunque no se pudo confirmar con la segunda transición. Por ello, ya no se realizó el análisis a las 48 horas de secado. En cambio, en la otra muestra de suelo sí pudo determinarse la concentración de MITC antes y después del secado observándose una disminución en la concentración del 40%, lo cual era en cierto modo previsible al tratarse de un compuesto muy volátil. Cabe destacar que en cada secuencia de análisis se incluyeron dos muestras control (QC) a los niveles validados (4 y 40 ng/g) para asegurar la calidad de los resultados obtenidos, obteniéndose recuperaciones mayores del 83%. La *Figura 6 del artículo científico 3* muestra los cromatogramas obtenidos para la muestra de suelo positiva en MITC analizada antes y después de la etapa de secado. Para asegurar la confirmación de la presencia de MITC se calculó la relación Q/q y su desviación respecto a un patrón en matriz. Los valores calculados para Q/q en todas las réplicas de suelo analizadas presentaron una desviación del orden del 3% en relación con el patrón, valor que está muy por debajo de la tolerancia máxima ($\pm 30\%$) admitida en la guía SANCO 12571/2013 (European Commission, 2013). Esto permitió confirmar la identidad del MITC en la muestra, cumpliendo los requisitos exigidos por la legislación.

En comparación con las publicaciones consultadas, la metodología desarrollada en esta Tesis es la primera basada en GC-MS/MS para la determinación de MITC, lo cual ha permitido alcanzar valores de LOQ y LOD extraordinariamente bajos. Además, la adquisición de dos transiciones permite realizar confirmación la identidad del compuesto en las muestras positivas de forma absolutamente fiable. El uso de suelos

con características diferentes en la preparación de los estándares en matriz y en las muestras fortificadas de ensayos de recuperación, así como los resultados de los controles de calidad analizados en la secuencia de análisis de suelos, demuestran la aplicabilidad del método a distintos tipos de suelo sin apreciarse efecto matriz notable. Debido a que el MITC es un analito altamente volátil se recomienda realizar su determinación en muestras que no hayan sido sometidas a ninguna etapa de secado, ya que parte del analito puede sufrir pérdidas por volatilización durante esta etapa.

CAPITULO 4

ACOPLAMIENTO LC-MS/MS

CAPITULO 4.1

DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE TIRAM EN FRUTAS Y VEGETALES POR LC-MS/MS

4.1.1. INTRODUCCIÓN

Los ditiocarbamatos (DTC) constituyen un grupo importante de compuestos organosulfurados con diversas aplicaciones en el campo de la agricultura, la medicina y en la industria del caucho y de la madera. En agricultura se utilizan como pesticidas aprovechando su rápida y efectiva acción fungicida, así como, su capacidad para la prevención frente al ataque de hongos. En función de su estructura química pueden clasificarse en tres grupos: dimetil-ditiocarbamatos, étilen-bis-ditiocarbamatos y propilen-bis-ditiocarbamatos. El principal problema derivado del uso de los DTC es su toxicidad. Aunque en función de su estructura química pueden descomponerse a disulfuro de carbono (CS_2), en el caso de dimetil-ditiocarbamatos, o a etilen-tiourea (ETU), en el caso de étilen-bis-ditiocarbamatos y propilen-bis-ditiocarbamatos, ambos productos de degradación son peligrosos por sus efectos, neurotóxico y cancerígeno, respectivamente.

El tiram (Figura 4.1) es un dimetil-ditiocarbamato ampliamente usado como fungicida no sistémico para la protección de semillas, tratamientos en frutas, vegetales y plantas ornamentales y para proteger productos vegetales durante su transporte y almacenamiento (Sharma, 2003). Además, puede aparecer como producto de transformación de otros dos ditiocarbamatos, el ferbam y el ziram. La presencia de residuos de tiram en muestras vegetales y ambientales, como suelos y aguas, puede ocasionar problemas de salud pública en personas y animales, así como en el medioambiente, si estos residuos están a niveles superiores a los recomendados.

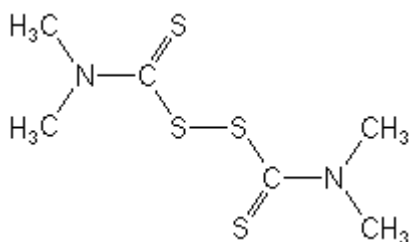


Figura 4.1. Estructura química del tiram

Tal como se ha indicado en el capítulo de introducción, la legislación europea establece límites máximos de residuos de pesticidas (LMR) en productos vegetales y de origen animal (Regulation (EC) No 396/2005). En el caso de los DTC, el LMR se expresa como la concentración final de CS₂ generado a partir de distintos productos como maneb, mancozeb, metiram, propineb, tiram y ziram. Sin embargo, esta definición es poco específica y no permite discriminar entre los distintos DTC, por lo que la legislación dicta que, siempre que sea posible, deben desarrollarse métodos individuales de análisis para cada DTC. La dificultad analítica asociada a la determinación de los DTC, derivada principalmente de su baja estabilidad, ha limitado el desarrollo de métodos de análisis específicos y ha supuesto un reto respecto a los métodos basados en la determinación de CS₂. En el caso de propineb, ziram y tiram, ya es posible expresar el LMR como la concentración individual de cada uno, por lo que el desarrollo y aplicación de métodos analíticos específicos, que permitan la cuantificación individual de cada compuesto, es actualmente necesaria. Concretamente en el caso del tiram, existe un documento de EFSA, que trata sobre la modificación de los LMR de tiram en bananas, en el que se establecen dos definiciones de residuo en función del objeto del análisis: si se trata de

monitorizar la presencia, se acepta la determinación de CS₂; pero si se trata de análisis específicos del analito, debe determinarse la concentración del producto original, tiram.

Desde el punto de vista analítico, el tiram es un compuesto problemático debido a que presenta elevada inestabilidad frente a pH ácido, temperatura, luz, humedad y presencia de materia orgánica (Roberts, 1999). En muestras vegetales, la actividad enzimática y los ácidos propios del vegetal también pueden provocar su descomposición (Blasco, 2004; Gupta, 2012; Heise, 2000). Así mismo, presenta elevada inestabilidad en el medio ambiente. En suelos y aguas, la degradación se produce en mayor medida en presencia de materia orgánica a pH ácido (Sharma, 2003). En aguas se puede producir además fotodegradación por acción de la luz solar (Filipe, 2013) y degradación por hidrólisis, aunque su baja solubilidad en medio acuoso hace que quede retenido mayoritariamente en las partículas del suelo o sedimentos, lo cual dificulta su transferencia al agua.

Teniendo en cuenta su baja estabilidad, la determinación de tiram se ha realizado durante décadas basándose en su descomposición mediante digestión ácida y posterior determinación del CS₂ generado (Caldas, 2001; Crnogorac, 2009; Malik, 1999; Sharma, 2003; Szolar, 2007; Vryzas, 2002). Estos métodos, tal como ya se ha indicado, carecen de especificidad y su aplicabilidad es reducida.

Por otro lado, resulta problemático incorporar el tiram en métodos multirresiduales, pues, normalmente, los resultados obtenidos, en términos de recuperación, no son satisfactorios (Lehotay, 2005b). A la hora de desarrollar un método analítico específico para tiram, deben controlarse y minimizarse todos los factores que pueden provocar su descomposición para que el método pueda ser fiable y robusto. En el caso de muestras vegetales, existen pocos antecedentes sobre métodos para la

determinación y cuantificación directa de tiram. Además, de acuerdo con la legislación, el LMR expresado como tiram para gran cantidad de muestras vegetales es 0.1 mg/kg, por lo que los métodos analíticos desarrollados deben tener suficiente sensibilidad para llegar a este bajo nivel.

Blasco et al. (Blasco, 2004) publicaron un método para la determinación individual de tiram, dazomet, disulfiram y sus metabolitos en muestras vegetales por LC-APCI-MS. En este trabajo, la inestabilidad y dificultad analítica del tiram queda reflejada en las bajas recuperaciones obtenidas para algunas de las matrices analizadas (<70%), entre ellas lechuga, nueces y cítricos. Además, el LOQ obtenido, definido como el nivel más bajo validado, es de 2.5 mg/kg, el cual no se adecúa a los LMR establecidos para este tipo de matrices.

Teniendo en cuenta que el tiram es un fungicida no sistémico y que además se degrada al entrar en contacto con los componentes de la matriz, tales como ácidos orgánicos, enzimas, etc., Heise y colaboradores (Heise, 2000) propusieron un método que consiste en realizar la extracción sobre la superficie del vegetal evitando que entre en contacto con el tejido seccionado, obteniendo buenas recuperaciones en las tres matrices estudiadas (pepino, manzana y lechuga). Ahora bien, este procedimiento no resultaría adecuado cuando se requiera una buena homogenización de la muestra.

Cajka et al. (Cajka, 2011) desarrollaron un método para determinar tiram y ziram en frutas, realizando el análisis tanto sobre la superficie de la fruta como sobre distintos estados de homogenización de la misma. Los resultados, en términos de recuperación, obtenidos cuando la extracción ocurría sobre la superficie fueron satisfactorios. En cambio, en las muestras homogenizadas se concluyó que si la homogenización se llevaba a cabo tras la fortificación, era necesario reducir la temperatura del proceso para reducir

al mínimo la actividad enzimática de la fruta y con ello reducir la degradación del tiram. A pesar de las precauciones tomadas, la recuperación obtenida no superó el 65% al nivel de 5 mg/kg.

Los antecedentes existentes indican claramente que el desarrollo de métodos de análisis de residuos de tiram en muestras vegetales, que incluyan etapas de homogenización, extracción y posterior determinación, constituye un reto desde el punto de vista analítico. En esta Tesis se ha desarrollado un método para la determinación directa de tiram en muestras vegetales basado en LC-ESI-MS/MS (*artículo científico 4*). A lo largo del desarrollo del método se hace especial hincapié en la minimización de la degradación del tiram y en el control de los factores que pueden favorecerla. El objetivo del trabajo que se muestra a continuación, es disponer de un método sensible que sea adecuado para el control de los LMRs establecidos en muestras vegetales, expresados como concentración de tiram.

4.1.2. ARTÍCULO CIENTÍFICO 4

Optimisation and validation of a specific analytical method for the determination of thiram residues in fruits and vegetables by LC–MS/MS

Aranzazu Peruga, Susana Grimalt, Francisco J. López, Juan V. Sancho, Félix Hernández

Food Chemistry (2012) 135: 186–192

Food Chemistry 135 (2012) 186–192

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

Analytical Methods

Optimisation and validation of a specific analytical method for the determination of thiram residues in fruits and vegetables by LC–MS/MS

Aranzazu Peruga, Susana Grimalt, Francisco J. López, Juan V. Sancho, Félix Hernández *

Research Institute for Pesticides and Water, University Jaume I, E-12071 Castellón, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
Received 25 October 2011
Received in revised form 15 March 2012
Accepted 16 April 2012
Available online 21 April 2012

Keywords:
Liquid chromatography
Tandem mass spectrometry
Thiram
Residues
Fruits and vegetables

ABSTRACT

Thiram is a non-systemic dithiocarbamate fungicide, which is easily degraded during sample preparation since it is affected by pH, matrix components and temperature. In this work, specific methodology for thiram analysis in vegetable (eggplant and lettuce) and fruit (strawberry) samples has been developed based on liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC–MS/MS). Minimising thiram degradation during standards storage and sample preparation was carefully studied. The effect of low temperature (about 5 °C), addition of a dehydrating agent (Na₂SO₄ anhydrous), pH regulator (NaHCO₃), and enzymatic activity reduction (EDTA) during extraction was evaluated. The optimised procedure was validated for eggplants, lettuces, and strawberries. Satisfactory recoveries, between 80% and 106%, and relative standard deviations below 10% were obtained at 0.1 and 0.01 mg/kg fortification levels (*n* = 5). Limits of detection below 0.0012 mg/kg were achieved. The validated method has been applied to eggplant and lettuce samples collected from different field trials as well as several strawberry and apple samples.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Thiram (Bis (dimethylthiocarbamoyl)-disulphide) is a dithiocarbamate fungicide used as a seed protectant and in foliar treatments on fruits, vegetables, ornamentals and turf crops to control a number of fungal diseases, as well as to protect harvested crops from deterioration in storage or transport. It is also a degradation product of other dithiocarbamate fungicides as Ferbam and Ziram (Walia, Sharma, & Parmar, 2009). Thiram has been used in the treatment of human scabies, as a sunscreen and as a bactericide applied directly to the skin or incorporated into soap (Sharma, Aulakh, & Malik, 2003). In general, the fungicidal action of dialkylthiocarbamates is a consequence of its capacity to inhibit metal dependant and sulphhydryl enzymes (Blasco, Font, & Pico, 2004), such as pyruvate dehydrogenase (Roberts & Hutson, 1999). In addition, thiram is also used as an accelerator for rubber vulcanization and as rubber antioxidant (Szolar, 2007).

Regarding analytical methodology for dithiocarbamate residues in fruits and vegetables, problems related with their stability have been reported, especially in acidic plant juices (Heise, Weber, & Alder, 2000). Dithiocarbamates easily decompose into carbon disulphide (CS₂) and the respective amine in acidic medium (Crnogorac & Schwack, 2009). Because of this reason, it is not easy to achieve satisfactory recoveries for these compounds when a standard procedure is applied in multiresidue methods (plant sample homogenisation and solvent extraction) (Lehotay, de Kok, Hiemstra, & van Bodegraven, 2005; Paya et al., 2007). In consequence, determination of dithiocarbamates has been based for decades on their decomposition, using hot-acid digestion and collecting evolving CS₂ for its determination, and applying analytical techniques such as spectrophotometry or gas chromatography (GC) (Caldas, Conceicao, Miranda, de Souza, & Lima, 2001; Crnogorac & Schwack, 2009; Malik & Faubel, 1999; Sharma et al., 2003; Szolar, 2007; Vryzas, Papadakis, & Papadopoulou-Mourkidou, 2002). These indirect methods are time-consuming, have not sufficient sensitivity and do not allow distinguishing between different dithiocarbamates.

Regarding environmental samples, very little has been published on thiram residue analysis. Most analytical methods reported are based on liquid chromatography (LC) coupled to UV detector, not enough selective and sensitive. Sun and Lee (2002) developed a microwave-assisted extraction methodology for five carbamates, including thiram, PAHs, PCBs and triazines in soil samples. Since thiram was found to degrade seriously, it was not possible to calculate recoveries or limit of detection (LOD). An efficient SPE clean-up step to remove humic substances in aqueous samples for thiram determination by HPLC–UV has been described (Filipe, Vidal, Duarte, & Santos, 2007). The method was tested in soil extracts spiked at high levels, and LODs were around 0.33 mg/L.

According to Regulation (EC) No 396/2005 (Commission Regulation, 2005), all dithiocarbamates result in the final CS₂ residue;

* Corresponding author. Tel.: +34 964 387366; fax: +34 964 387368.
E-mail address: felix.hernandez@qf.uji.es (F. Hernández).

0308-8146/\$ – see front matter © 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.064>

Optimisation and validation of a specific analytical method for the determination of thiram residues in fruits and vegetables by LC–MS/MS

Food Chemistry (2012) 135: 186-192

Aranzazu Peruga, Susana Grimalt, Francisco J. López, Juan V. Sancho, Félix Hernández

Research Institute for Pesticides and Water, University Jaume I, E-12071 Castellón, Spain

Received 25 October 2011; Revised 15 March 2012; Accepted 16 April 2012; Available online 21 April 2012. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.04.064

ABSTRACT

Thiram is a non-systemic dithiocarbamate fungicide, which is easily degraded during sample preparation since it is affected by pH, matrix components and temperature. In this work, specific methodology for thiram analysis in vegetable (eggplant and lettuce) and fruit (strawberry) samples has been developed based on liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Minimising thiram degradation during standards storage and sample preparation was carefully studied. The effect of low temperature (about 5°C), addition of a dehydrating agent (Na₂SO₄ anhydrous), pH regulator (NaHCO₃), and enzymatic activity reduction (EDTA) during extraction was evaluated. The optimised procedure was validated for eggplants, lettuces, and strawberries. Satisfactory recoveries, between 80% and 106%, and relative standard deviations below 10% were obtained at 0.1 and 0.01 mg/kg fortification levels (n = 5). Limits of detection below 0.0012 mg/kg were achieved. The validated method has been applied to eggplant and lettuce samples collected from different field trials as well as several strawberry and apple samples.

Keywords: Liquid chromatography; Tandem mass spectrometry; Thiram; Residues; Fruits and vegetables.

* Corresponding author. Tel.: +34 964 387366; fax: +34 964 387368. *E-mail address:* felix.hernandez@qfa.uji.es (F. Hernández).

1. Introduction

Thiram (Bis (dimethylthiocarbamoyl)-disulphide) is a dithiocarbamate fungicide used as a seed protectant and in foliar treatments on fruits, vegetables, ornamentals and turf crops to control a number of fungal diseases, as well as to protect harvested crops from deterioration in storage or transport. It is also a degradation product of other dithiocarbamate fungicides as Ferbam and Ziram (Walia, Sharma, & Parmar, 2009). Thiram has been used in the treatment of human scabies, as a sunscreen and as a bactericide applied directly to the skin or incorporated into soap (Sharma, Aulakh, & Malik, 2003). In general, the fungical action of dialkyldithiocarbamates is a consequence of its capacity to inhibit metal dependant and sulphydryl enzymes (Blasco, Font, & Pico, 2004), such as pyruvate dehydrogenase (Roberts & Hutson, 1999). In addition, thiram is also used as an accelerator for rubber vulcanization and as rubber antioxidant (Szolar, 2007).

Regarding analytical methodology for dithiocarbamate residues in fruits and vegetables, problems related with their stability have been reported, especially in acidic plant juices (Heise, Weber, & Alder, 2000). Dithiocarbamates easily decompose into carbon disulphide (CS_2) and the respective amine in acidic medium (Crnogorac & Schwack, 2009). Because of this reason, it is not easy to achieve satisfactory recoveries for these compounds when a standard procedure is applied in multiresidue methods (plant sample homogenisation and solvent extraction) (Lehotay, de Kok, Hiemstra, & van Bodegraven, 2005; Paya et al., 2007). In consequence, determination of dithiocarbamates has been based for decades on their decomposition, using hot-acid digestion and collecting evolving CS_2 for its determination, and applying analytical techniques such as spectrophotometry or gas chromatography (GC) (Caldas, Conceicao,

Miranda, de Souza, & Lima, 2001; Crnogorac & Schwack, 2009; Malik & Faubel, 1999; Sharma et al., 2003; Szolar, 2007; Vryzas, Papadakis, & Papadopoulou-Mourkidou, 2002). These indirect methods are time-consuming, have not sufficient sensitivity and do not allow distinguishing between different dithiocarbamates.

Regarding environmental samples, very little has been published on thiram residue analysis. Most analytical methods reported are based on liquid chromatography (LC) coupled to UV detector, not enough selective and sensitive. Sun and Lee (2002) developed a microwave-assisted extraction methodology for five carbamates, including thiram, PAHs, PCBs and triazines in soil samples. Since thiram was found to degrade seriously, it was not possible to calculate recoveries or limit of detection (LOD). An efficient SPE clean-up step to remove humic substances in aqueous samples for thiram determination by HPLC-UV has been described (Filipe, Vidal, Duarte, & Santos, 2007). The method was tested in soil extracts spiked at high levels, and LODs were around 0.33 mg/L.

According to Regulation (EC) No 396/2005 (Commission Regulation, 2005), all dithiocarbamates result in the final CS₂ residue; therefore, discrimination among them is generally not possible. Single residue methods should be implemented on a case by case basis when the specific quantification of thiram is required. In another document from European Food Safety Authority (EFSA) on Modification of the existing Maximum Residue Levels MRL for thiram in bananas (European Food Safety Authority, 2008), the following residue definitions for enforcement are established: for screening, total CS₂ residues; for cases of concern, thiram. When a specific and selective method is available, MRLs have to be expressed as thiram concentration. For selected matrices (eggplant,

lettuce and strawberry) MRLs established are 0.1, 2, and 10 mg/kg, respectively, being 0.1 mg/kg the lower limit of analytical determination (Commission Regulation, 2005).

Consequently, to make available a specific MRL for thiram, it is necessary to develop reliable analytical methods for its individual determination at least at 0.1 mg/kg. LC coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) is highly appropriate for polar/non-volatile analytes at low concentration due to its excellent selectivity and sensitivity, allowing the reliable identification and quantification of the analytes at low residue levels. Moreover, the acquisition of at least two specific transitions working in Selected Reaction Monitoring (SRM) mode leads to a reliable confirmation of the identity of the analyte detected in the sample (Pozo, Sancho, Ibanez, Hernandez, & Niessen, 2006). LC-MS/MS appears as an excellent technique that fits well with the physicochemical characteristics of thiram.

To our knowledge, only one analytical method based on LC-MS has been reported for thiram residue analysis. Blasco et al. have proposed a matrix solid-phase extraction followed by LC-APCI-MS determination for the simultaneous analysis of dithiocarbamates, including thiram, and their degradation products in plants (Blasco et al., 2004). Although the results were in general satisfactory, however thiram was not well recovered in some crops as fruits with high acid content (orange and lemon). Moreover, a limit of quantification (LOQ) as high as 2.5 mg/kg was reported for thiram in the rest of matrices, with recoveries between 60% and 101% in samples spiked at this concentration level.

Due to the lack of robust analytical methodology for thiram, the aim of this work is to develop an efficient and sensitive LC-MS/MS method for quantification and confirmation of thiram in fruit and vegetable samples. Special attention is given to

relevant aspects like minimising thiram degradation during sample preparation and the stability of thiram in solvent, samples and raw extracts.

2. Material and methods

2.1. Reagents and chemicals

Thiram reference standard was purchased from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). HPLC-grade acetonitrile and methanol, residue analysis acetone and sodium sulphate anhydrous, reagent grade ammonium acetate and lithium acetate, reagent grade sodium hydrogen carbonate and synthesis grade ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA) were purchased from ScharLab (Barcelona, Spain). LC-grade water was obtained by purifying demineralized water in a Milli-Q Gradient A10 (Millipore, Billerica, MA, USA).

Stock standard solution of thiram was prepared dissolving 50 mg powder, accurately weighted, in 100 mL acetone obtaining a final concentration of 500 µg/mL, which was stored at -20°C. Working solutions, used for LC-MS/MS analysis or for sample fortification, were obtained by diluting stock solution with acetone and stored at -20°C.

2.2. Instrumentation

An HPLC system Waters Alliance 2795 (Waters, Milford, MA, USA) was interfaced to a Quattro micro triple quadrupole mass spectrometer (Waters) using an orthogonal Z-spray-electrospray interface (ESI). The LC separation was performed by injecting 30 µL of sample in a Discovery C₁₈ column (50 x 2.1 mm i.d., 5 µm) (Supelco, Bellefonte, PA, USA), at a flow rate of 300 µL/min. The mobile phase used was a water-methanol

gradient at 0.1 mM ammonium acetate where the percentage of methanol was changed linearly as follows: 0 min, 5%; 1 min, 90%; 3 min, 90%; 3.1 min, 5%. Sample vials in the auto-sampler of the LC system were at 5°C. Drying gas as well as nebulising gas was nitrogen generated from pressurised air in a high purity nitrogen generator NM30LA 230Vac Gas Station from Peak Scientific (Inchinnan, Scotland). The desolvation and cone gas flows were selected to 600 L/h and 60 L/h, respectively. Infusion experiments were performed using the built-in syringe pump, directly connected to the interface.

For operation in MS/MS mode, collision gas was Argon 99.995% (Praxair, Valencia, Spain) with a pressure of 3×10^{-3} mbar in the collision cell. Capillary voltages of 3.5 kV were used in positive ionisation mode. The interface temperature was set to 350°C and the source temperature to 120°C. Dwell times of 0.2 s were chosen for each transition. A solvent delay of 2 min was selected to give an additional clean-up using the built-in divert valve controlled by the Masslynx NT v.4.0 software. The quantification (Q) and confirmation (q_1 , q_2 , and q_3) transitions were $241 > 88$, $241 > 120$, $241 > 196$ and $241 > 76$, respectively, optimised at cone voltage of 15 V and collision energy of 10, 15, 5 and 35 eV, respectively. The application manager QuanLynx was used to process the quantitative data obtained from calibration standards and from crop samples.

2.3. Sample preparation

In order to avoid thiram degradation, sample chopping and extraction was carried out directly on frozen samples. All operations performed during sample preparation were done at low temperature (about 5°C), with the material introduced in an ice bath. Frozen samples were quarterly cut into small pieces directly to obtain 50 g sample (precision 0.1 mg). Eggplant, lettuce, and apple samples were triturated and extracted, in presence of 50 g sodium sulphate anhydrous and 0.3 g EDTA, with 100 mL acetonitrile using a manual blender BP4576 vario mixer 750 (Ufesa, Barcelona, Spain). The entire extract was filtered through a 25-30 µm filter paper (Filtros ANOIA S.A., Barcelona, Spain), washed with 25 mL acetonitrile and the volume adjusted to 200 mL with acetonitrile. In order to remove small solid particles, an aliquot of the raw extract was passed through a 0.45 µm Nylon syringe filter (Scharlab, Barcelona, Spain). Finally, 30 µL of extract were directly injected in the LC-MS/MS system.

Sample extraction was slightly modified for acidic samples like strawberry. Double amount of Na₂SO₄ (100 g) was used, and 3.5 g of NaHCO₃ were also added during extraction following the same procedure described above, keeping the same amount of EDTA (0.3 g). The need to perform this modification will be lately discussed in the manuscript.

Matrix-matched standards were prepared using blank samples that were extracted accordingly to the sample preparation procedure. After extraction, an aliquot of the blank raw extract was transferred to a 10 mL volumetric flask, and 1 mL of the corresponding standard solution was added. Volume was adjusted to 10 mL with the blank raw extract.

Both, sample extracts and matrix-matched standards, were maintained all the time in an ice bath, at below 5°C until analysis. If it was not performed within 8 h sample extracts and matrix-matched standards were put into the freezer at ≤20°C. Moreover, sample vials were also maintained refrigerated at $5 \pm 1^\circ\text{C}$ during LC-MS/MS.

Fortification of samples for recovery experiments was performed by delivering 1 mL of thiram standard solution (at 0.5 or 5 µg/mL in acetone) to 50 g of frozen sample in order to obtain 0.01 and 0.1 mg/kg fortification levels, respectively. The final thiram concentration in each extract was 2.5 ng/mL (for 0.01 mg/kg) and 25 ng/mL (for 0.1 mg/kg).

Table 1. MS/MS optimized conditions for thiram standard.

Precursor ion (<i>m/z</i>)	Cone (V)	Product Ion (<i>m/z</i>)	Fragment	Collision (eV)	Q/q ratio*
241	15	88 (Q)	C ₃ H ₆ NS	10	
241	15	120 (q ₁)	C ₃ H ₆ NS ₂	15	1.5
241	15	196 (q ₂)	C ₄ H ₆ NS ₄	5	4.1
241	15	76 (q ₃)	C ₃ H ₈ S	35	10

*Average value for matrix-matched standards

2.4. Validation study

Statistical validation of the method was performed on the basis of the European SANCO guidelines (SANCO/3029/99 rev.4., 2000; SANCO/825/00 rev.7., 2004) in different types of fruit and vegetable samples (eggplant, lettuce and strawberry). Linearity, accuracy, precision, specificity, limit of quantification (LOQ) and limit of detection (LOD) were the analytical characteristics evaluated.

The matrix-matched calibration curve was performed by analysing, in triplicate, 8 standard solutions at concentrations between 1 and 250 ng/mL.

Accuracy of the method was estimated by means of recovery experiments performed on samples spiked at two levels (0.01 and 0.1 mg/kg). All experiments were carried out with five replicates. Precision of the method (repeatability) was evaluated within the same day at each recovery level, and it was calculated in terms of relative standard deviation (RSD) for five replicates.

The limit of detection (LOD) was estimated as the analyte concentration that produced a peak signal of three times the background noise. It was calculated from the chromatogram at the lowest point used in the matrix-matched calibration. The LOQ objective was established as the lowest concentration level that was fully validated using the overall analytical procedure with satisfactory recovery (70-110%) and precision (RSD <20%). In both cases, calculations were made using the signals corresponding to the most sensitive transition, i.e. the quantification transition (Q).

In order to evaluate the ability of the analytical procedure to give a selective measurement for the analyte, the specificity was tested by analysing a procedure blank, a sample blank and a sample blank spiked with thiram at the LOQ level. The response

should not exceeded 30% the LOQ signal to consider the method to have satisfactory specificity.

In addition to the LOD and LOQ, the limit of confirmation (LOC) was also estimated. It was calculated, for a signal-to-noise of 3, from the chromatograms corresponding to the confirmative transitions at the lowest analyte concentration tested.

2.5. Application to real samples

For the development and validation of the method, vegetable and fruit samples were purchased from an organic farming grocery. Samples analysed to test the applicability of the method were obtained from experimental fields, where thiram was applied as post-harvest fungicide. In the case of apple samples, they were purchased from a local supermarket.

2.6. Data evaluation and confirmation

Quantification of thiram in the samples analysed was carried out using matrix-matched calibration. At least two quality control (QC) samples, i.e. blank samples fortified with thiram at two levels (0.01 and 0.1 mg/kg), were included in each sample batch. All the sample extracts were injected in duplicate and the results were only accepted if recoveries for QC samples were satisfactory (between 70% and 110%).

Q/q ratios, defined as the ratios between the intensity of the quantification transition (Q) and the confirmation transitions (q_1 , q_2 and q_3), were used to confirm peak identity in samples. Firstly, the theoretical Q/q ratio was calculated as the mean value for the standard solutions injected in the linearity study (i.e. matrix-matched standards). To confirm a finding as an actual positive, experimental Q/q ratios should fit the

theoretical Q/q ratios of the reference standard. Maximum tolerance depends on the value of Q/q ratio, according to Sanco guideline (SANCO/10684/, 2009): 20% for Q/q_1 ratio (lower than 2), 25% for Q/q_2 ratio (between 2 and 5) and 50% for Q/q_3 ratio (higher than 10) (see Table 1).

3. Results and discussion

3.1. MS optimisation

Full scan acquisition and MS/MS spectra in the presence of different additives were obtained from infusion of 5 $\mu\text{g/mL}$ thiram standard solution (50:50 acetone:water) at a flow rate of 10 $\mu\text{L/min}$ (Fig. 1). Thiram presented positive ionisation as a result of its sulphur skeleton close to the tertiary amine in its chemical structure.

The full scan mass spectrum presented three abundant peaks at m/z 241, 263 and 279 corresponding to $[\text{M}+\text{H}]^+$ and the adducts $[\text{M}+\text{Na}]^+$ and $[\text{M}+\text{K}]^+$, respectively (Fig. 1a, left). In the MS optimisation procedure, the use of ammonium acetate as additive was tested. This led to an increase in the abundance of the $[\text{M}+\text{H}]^+$ ion, whereas $[\text{M}+\text{Na}]^+$ and $[\text{M}+\text{K}]^+$ adducts dramatically decreased (Fig. 1b, left). Three main product ions were obtained when $[\text{M}+\text{H}]^+$ was selected as precursor ion in MS/MS experiments (Fig. 1b, right) m/z 196, 120 and 88, corresponding to $\text{C}_4\text{H}_6\text{NS}_4$, $\text{C}_3\text{H}_6\text{NS}_2$ and $\text{C}_3\text{H}_6\text{NS}$ positive charged fragments, respectively. The m/z 88 was the most abundant product ion at collision energy of 10 eV. Moreover, a fourth less abundant product ion was observed at higher collision energies (from 30 to 40 eV) at m/z 76, corresponding to $\text{C}_3\text{H}_8\text{S}$ (not shown in the Figure). When the sodium adduct was selected as precursor in MS/MS experiments only three product ions were obtained (Fig. 1a, right), the most abundant

being at m/z 143 ($C_3H_6NS_2Na$). The worst fragmentation occurred for potassium adduct, which presented only one product ion at m/z 159 ($C_3H_6NS_2K$), and therefore any additional confirmative transition could not be selected in this case.

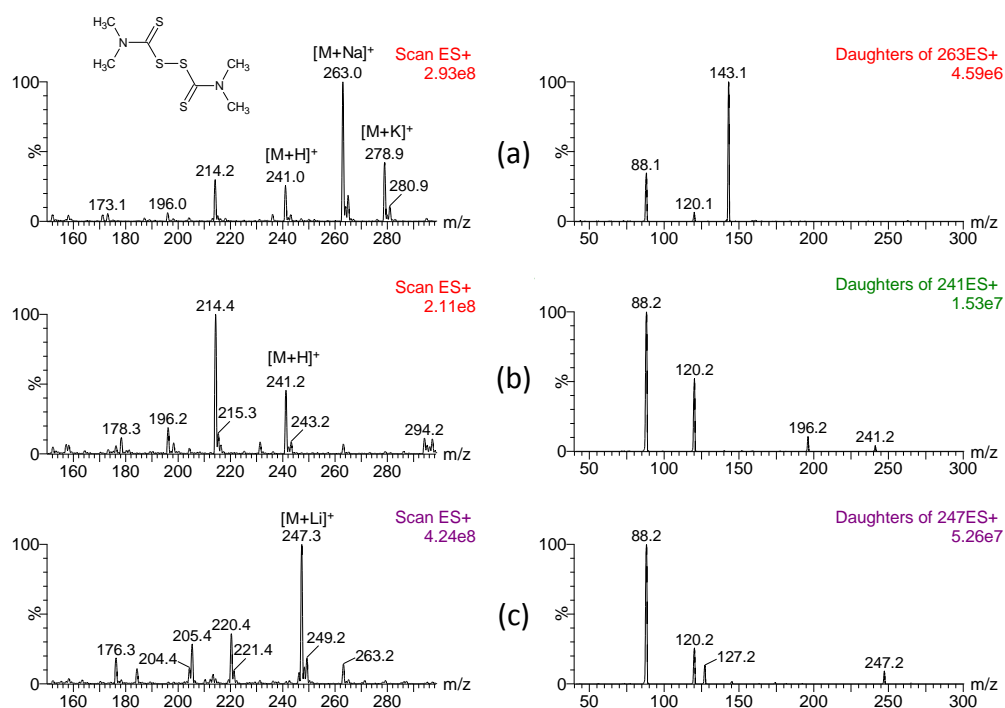


Fig. 1. Positive ion electrospray full scan mass spectra (left) of thiram acquired by infusion of 5 $\mu g/mL$ standard solution with different cone voltage and additives: (a) without additive at 15 V, (b) 5 mM NH_4OAc at 15 V, (c) 1 mM LiOAc at 30V. Product ion spectra (right): m/z 263 as precursor ion, without additive, at 30 V cone voltage and 20 eV collision energy; m/z 241 as precursor ion, with 5 mM NH_4OAc , at 15 V cone voltage and 10 eV collision energy; m/z 247 as precursor ion, with 1 mM LiOAc, at 30 V cone voltage and 15 eV collision energy.

Based on our own experience with other compounds of difficult ionisation in API interfaces (Grimalt, Pozo, Marin, Sancho, & Hernandez, 2005), we also tested the formation of adducts with monovalent metals in order to get better sensitivity and specificity in MS/MS experiments. The infusion of standard solutions in the presence of lithium acetate led to a full acquisition spectra where the most abundant ion (m/z 247) corresponded to $[M+Li]^+$ (Fig. 1c, left). Selecting this as precursor ion, led to three product ions (Fig. 1c, right), at m/z 127, 120, and 88, corresponding to $C_3H_6NS_2Li$, $C_3H_6NS_2$, and C_3H_6NS positive charged fragments, respectively.

As it can be seen in Fig. 1, rather similar results were obtained by using $[M+H]^+$ and $[M+Li]^+$ as precursor ions in the presence of ammonium acetate and lithium acetate, respectively. Later, when standard solutions were injected in the LC-MS/MS system, the optimum conditions for thiram determination corresponded to 0.1 mM NH_4OAc into the mobile phase, which led to a satisfactory compromise between sensitivity and reproducibility. For this reason, the most abundant product ion (Q transition, $241 > 88$) was used for quantitative purposes, and the other three product ions for confirmative purposes (transitions q_1 $241 > 120$, q_2 $241 > 196$ and q_3 $241 > 76$), using in all cases the protonated molecule m/z 241 as precursor ion. (Table 1).

3.2. Stability of standards solutions

Stability of working standards at low temperature was tested. In a first approach, standard solutions were stored at 4°C in a fridge. After only a few days, we observed a significant degradation, concluding that standards must be stored at -20°C in a freezer to prevent thiram degradation. Under these conditions, the stability was ensured for at least during one month, as new standard solutions were prepared monthly. Moreover, when working solutions were prepared it was necessary to use an ice bath where all the

material and solvents were introduced, in order to protect the analyte from thermal degradation.

3.3. Sample preparation optimization

Optimisation of the sample preparation was carried out over eggplant samples. Then the optimised procedure was tested in the rest of the matrices.

Sample preparation is a problematic step in the analysis of dithiocarbamates due to their instability (which is affected by the pH, temperature, moisture, enzymatic activity and plant components), as has been widely reported in the scientific literature (Blasco et al., 2004; Crnogorac & Schwack, 2009; Roberts & Hutson, 1999; Sharma et al., 2003). For this reason, a thiram stability study in eggplant extracts and in samples was carried out. The following acetonitrile extracts were evaluated: a sample extract fortified with thiram at 25 ng/mL (corresponding to 0.1 mg/kg in sample), and three extracts obtained from eggplant samples fortified at 0.1 mg/kg thiram before extraction (one sample extracted immediately after fortification and the other two samples extracted one hour and one day after fortification, both maintained at room temperature). The results obtained showed a thiram degradation of about 70% for the sample extracted one hour after fortification, whereas after 24 h of fortification, thiram degradation was practically complete (98%).

In order to avoid the degradation during the sample preparation, several approaches were considered. Firstly, the addition of anhydrous sodium sulphate during the extraction in order to prevent degradation by moisture or hydrolytic interaction. In the case of eggplant matrix, the addition of an amount of Na₂SO₄ similar to the sample mass processed was found to be optimal. The use of sodium sulphate allowed to

increase the thiram recovery from approximately 30% to 40%, but it did not avoid degradation, which still remained surely due to other concurrent processes like enzymatic reactions.

A way to reduce enzymatic activity is to work at non-optimal conditions, such as low temperature, extreme pH or 'complex' the cofactor ions that allow suitable enzymatic activity (Ca^{2+} , Cu^{2+} , etc.) with chelating agents as EDTA (Filipe, Vidal, Duarte, & Santos, 2008). Working at extreme pH, both acid and basic, was discarded because of the instability of thiram under these conditions. The effect of EDTA addition during the extraction was studied at different concentrations (2 and 20 mM EDTA in the final extract). Better results were observed when adding 0.3 g of EDTA (2 mM in the extract), although recoveries obtained were not yet fully acceptable (65%). In order to fully avoid thiram degradation, it was also necessary to perform sample preparation at low temperature. Thus, crushing and extraction of samples were performed directly on frozen samples, and all operations carried out during sample preparation were made at low temperature (about 5°C), with the material introduced in ice bath. In this way, satisfactory recoveries, around 90%, were achieved.

It is necessary to emphasise the importance of maintaining low temperatures along the overall process of sample preparation. It was critical to take the samples from the freezer immediately before processing them, the blank for preparing matrix-matched calibration included. When field samples were analysed, maintaining low temperatures along sample preparation process was also required to obtain reliable results and satisfactory QC recoveries.

The optimised procedure for eggplant was applied to lettuce and strawberry samples. Satisfactory recoveries were also obtained for lettuce, but recoveries around

40% were still obtained for strawberries. These low values were surely a consequence of the higher acidity and water percentage in strawberries. Moreover, during extraction step, removal of water is more problematic in strawberry than in lettuce, making more difficult the homogenisation with sodium sulphate and the organic solvent. Several sample preparation modifications were considered for this type of samples, such as using double amount of Na_2SO_4 , and the addition of a basic reagent in order to reduce the extract acidity. For this purpose, volatile and easily decomposable basic compounds are recommended to avoid ion suppression or salt precipitation in the interface of the LC-MS/MS instrument. The addition of 3.5 g of sodium hydrogen carbonate (200 mM NaHCO_3 in the final extract) as pH regulator was considered. With the new conditions, satisfactory recoveries (around 85%) were also obtained for strawberry matrix.

3.4. Method validation

Linearity of the method was satisfactory in the range tested (1-250 ng/mL, equivalent to 0.004-1 mg/kg in sample). Calibration curves showed a good adjustment to a first-order equation for eggplant and lettuce, and second-order equation for strawberry. Correlation coefficients higher than 0.995 and residuals lower than 20% were obtained in all cases.

Precision (repeatability) and accuracy (recovery), were estimated by analysing, in quintuplicate, blank samples spiked at two levels (0.01 and 0.1 mg/kg). The method led to satisfactory recoveries and excellent precision (Table 2) with average recoveries between 80% and 106% for two levels assayed in all matrices, and RSD always lower than 10%. Therefore, the lowest validated level, 0.01 mg/kg, was established as LOQ objective. On the other hand LODs below 0.0012 mg/kg were estimated from chromatograms at the lowest point of matrix-matched calibration. The high sensitivity

of the method allows monitoring the compliance with the MRLs established. An improvement of required sensitivity is clearly obtained in the case of eggplants, where MRL of 0.1 mg/kg has been established as the limit of determination reported during registration. In our work, this value could be lowered to 0.01 mg/kg, the lowest concentration fully validated following the overall analytical procedure. In addition, the presence of thiram in positive samples can be confirmed at these low levels, using the confirmatory transitions, as the limit of confirmation (LOC) was 0.0002, 0.0005 or 0.001 mg/kg depending on whether the transition q_1 , q_2 or q_3 was used for confirmation, in the case of eggplant. (Table 2).

Fig. 2 shows representative validation chromatograms in eggplants for a blank sample, a sample spiked at 0.01 mg/kg (LOQ), and a matrix-matched standard at 2.5 ng/mL.

Table 2. Results of quantitative validation for thiram in three sample matrices. (n=5)

Matrix	Recovery (RSD)		LOD (mg/Kg)	LOC (mg/Kg)		
	0.01 mg/Kg	0.1 mg/Kg		Q/q1	Q/q2	Q/q3
Eggplant	82 (1)	84 (5)	0.00012	0.0002	0.0005	0.001
Lettuce	106 (3)	97 (5)	0.0006	0.0012	0.0024	0.0053
Strawberry	91 (9)	80 (8)	0.0012	0.0029	0.0047	0.0081

3.5. Analysis of samples

The developed procedure was applied to four eggplant samples obtained from an experimental field where four drip-irrigation applications of thiram were made, three lettuce samples and three strawberry samples where thiram was applied as postharvest fungicide. In eggplant and strawberry samples no residues were found, but in one of lettuce samples, thiram was found at a concentration around 0.13 mg/kg. Fig. 3 shows the chromatograms corresponding to the positive lettuce sample, the Quality Control at 0.1 mg/ kg and matrix-matched standard at this level (25 ng/mL).

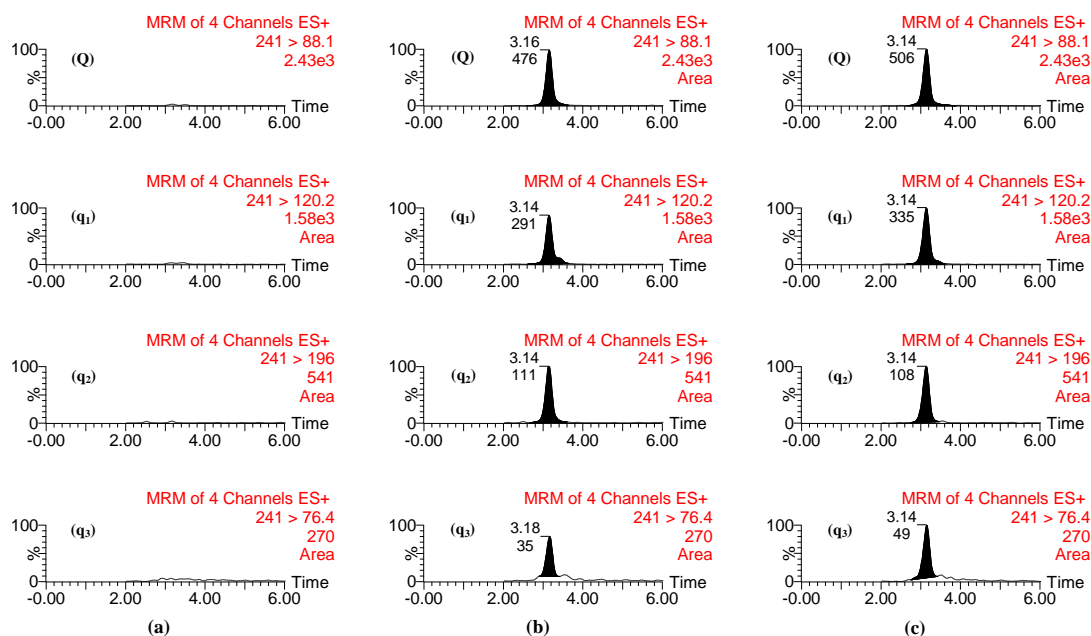


Fig. 2. Representative LC-MS/MS chromatograms for eggplant: (a) blank sample, (b) eggplant spiked at 0.01 mg/kg, (c) matrix-matched standard at 2.5 ng/mL.

The acquisition of four transitions allowed the confirmation of thiram identity in lettuce sample. The calculation of Q/q ratios in the sample and its comparison with matrix-matched calibration standards confirmed peak identity, as the deviations did not exceed 5% in any of the three transitions used for confirmation. QCs used for quality control not only showed satisfactory recoveries, but also Q/q ratios in agreement with the matrix-matched standards.

In addition, the optimised procedure for eggplants and lettuce was also applied to analyse two commercial apple samples, including matrix-matched standards and two QCs at 0.01 and 0.1 mg/kg. Satisfactory recoveries were obtained for both QCs (80% for low and 85%, for high level) and first-order equation calibration ($r>0.997$) was considered for quantification of apple samples, showing that the method was also satisfactory for apple. None of the samples analysed were positive to thiram.

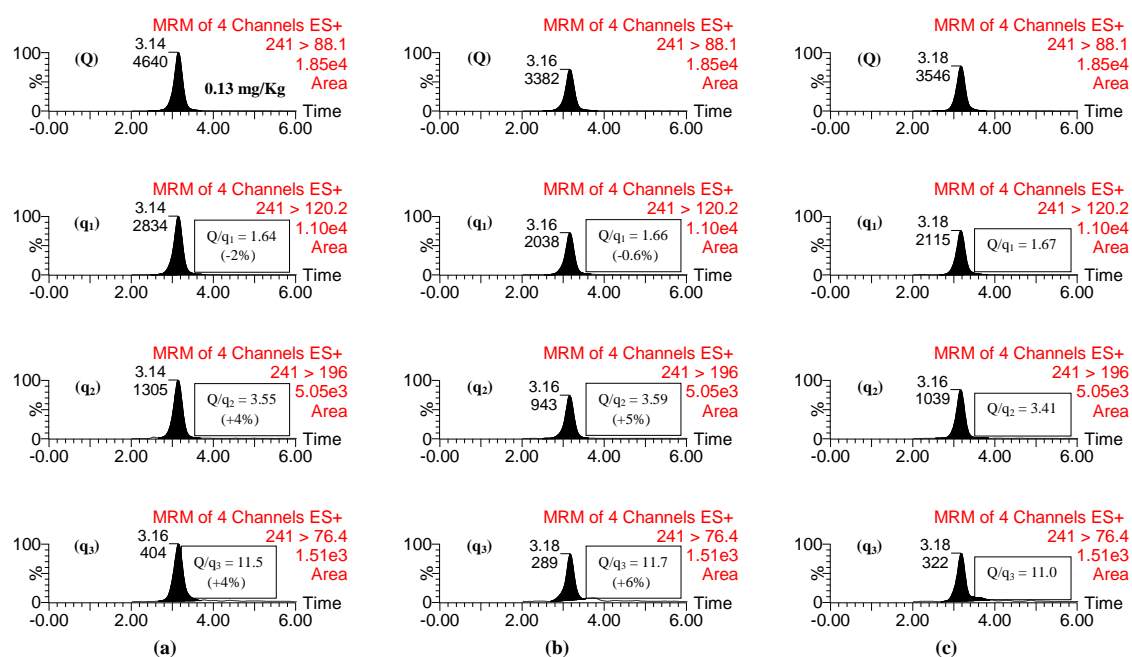


Fig. 3. Lettuce chromatograms of: (a) sample analyzed (0.13 mg/Kg), (b) QC at 0.1 mg/kg (recovery 95%), and (c) matrix-matched standard at 25 ng/mL. Q/q ratios and deviations from those of matrix-matched standards are also shown in the chromatograms.

4. Conclusions

This work has shown the difficulties associated with the residue determination of the dithiocarbamate fungicide thiram in fruits and vegetables, mainly due to its degradation during sample preparation. After a careful optimisation of this step, the method developed has allowed the determination of this compound at low residue levels (0.01 mg/kg) in eggplants, lettuce, strawberry, and apple, injecting directly the raw acetonitrile extracts in the LC-MS/MS system.

LC-MS/MS has been proved to be a rapid, sensitive and selective technique for the specific determination of thiram residues in vegetable and fruit samples. The use of four MS/MS transitions, one for quantification and three for confirmation, together with the high sensitivity reached make this analytical methodology fully appropriate to monitoring the compliance with MRL, and minimises the possibility of reporting false positives.

Acknowledgment

The authors acknowledge the support of Generalitat Valenciana, as research group of excellence (Prometeo 2009/054).

References

- Blasco, C., Font, G., & Pico, Y. (2004). Determination of dithiocarbamates and metabolites in plants by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1028(2), 267-276.
- Caldas, E. D., Conceicao, M. H., Miranda, M. C. C., de Souza, L. C. K. R., & Lima, J. F. (2001). Determination of dithiocarbamate fungicide residues in food by a spectrophotometric method using a vertical disulfide reaction system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4521-4525.
- Commission Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/ 414/EEC. Official Journal of the European Union, L70 of 16/3/2005.
- Crnogorac, G., & Schwack, W. (2009). Residue analysis of dithiocarbamate fungicides. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 28(1), 40-50.
- European Food Safety Authority. (2008). Modification of the existing MRL for thiram in bananas. *European Food Safety Authority Scientific Report*, 210, 1-29.
- Filipe, O. M. S., Vidal, M. M., Duarte, A. C., & Santos, E. B. H. (2008). Influence of fulvic acids and copper ions on thiram determination in water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(16), 7347-7354.
- Filipe, O. M. S., Vidal, M. M., Duarte, A. C., & Santos, E. B. H. (2007). A solid-phase extraction procedure for the clean-up of thiram from aqueous solutions containing high concentrations of humic substances. *Talanta*, 72(3), 1235-1238.

Grimalt, S., Pozo, O. J., Marin, J. M., Sancho, J. V., & Hernandez, F. (2005). Evaluation of different quantitative approaches for the determination of noneasily ionizable molecules by different atmospheric pressure interfaces used in liquid chromatography tandem mass spectrometry: Abamectin as case of study. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 16(10), 1619-1630.

Heise, S., Weber, H., & Alder, L. (2000). Reasons for the decomposition of the fungicide thiram during preparation of fruit and vegetable samples and consequences for residue analysis. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 366(8), 851-856.

Lehotay, S. J., de Kok, A., Hiemstra, M., & van Bodegraven, P. (2005). Validation of a fast and easy method for the determination of residues from 229 pesticides in fruits and vegetables using gas and liquid chromatography and mass spectrometric detection. *Journal of AOAC International*, 88(2), 595-614.

Malik, A. K., & Faubel, W. (1999). Methods of analysis of dithiocarbamate pesticides: A review. *Pesticide Science*, 55(10), 965-970.

Paya, P., Anastassiades, M., Mack, D., Sigalova, I., Tasdelen, B., Oliva, J., et al. (2007). Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389, 1697-1714.

Pozo, O. J., Sancho, J. V., Ibanez, M., Hernandez, F., & Niessen, W. M. A. (2006). Confirmation of organic micropollutants detected in environmental samples by liquid chromatography tandem mass spectrometry: Achievements and pitfalls. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 25(10), 1030-1042.

Roberts, T., & Hutson, D. (1999). Metabolic pathways of agrochemicals. In P. J. Jewess, P. W. Lee, P. H. Nicholls, & J. R. Plimmer (Eds.), *Part two insecticides and fungicides* (pp. 1180-1185). Cronwall, UK: The Royal Society of Chemistry.

SANCO/3029/99 rev.4. (2000). Residues: Guidance for generating and reporting methods of analysis in support of pre-registration data requirements for Annex II (part A, Section 4) and Annex III (part A, Section 5) of Directive 91/414. European Commission Directorate General Health and Consumer Protection.

SANCO/825/00 rev.7. (2004). Guidance document on pesticide residue analytical methods. European Commission Directorate General Health and Consumer Protection.

SANCO/10684/2009. (2009). Method validation and quality control procedures for pesticides residues analysis in food and feed. European Commission Directorate General Health and Consumer Protection.

Sharma, V. K., Aulakh, J. S., & Malik, A. K. (2003). Thiram: Degradation, applications and analytical methods. *Journal of Environmental Monitoring*, 5(5), 717-723.

Sun, L., & Lee, H. K. (2002). Microwave-assisted extraction behavior of nonpolar and polar pollutants in soil with analysis by high-performance liquid chromatography. *Journal of Separation Science*, 25(1-2), 67-76.

Szolar, O. H. J. (2007). Environmental and pharmaceutical analysis of dithiocarbamates. *Analytica Chimica Acta*, 582(2), 191-200.

Vryzas, Z., Papadakis, E. N., & Papadopoulou-Mourkidou, E. (2002). Microwave-assisted extraction (MAE)-acid hydrolysis of dithiocarbamates for trace analysis in tobacco and peaches. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(8), 2220-2226.

Walia, S., Sharma, R. K., & Parmar, B. S. (2009). Isolation and simultaneous LC analysis of thiram and its less toxic transformation product in DS formulation. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 83(3), 363-368.

4.1.3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Optimización de las condiciones cromatográficas y de MS/MS

La optimización de las condiciones de espectrometría de masas se realizó mediante la infusión de un patrón de 5 µg/mL utilizando distintos valores de voltaje de cono, obteniendo en todos los casos como ión mayoritario m/z 263, el cual corresponde a $[M+Na]^+$. De acuerdo con la experiencia previa en nuestro grupo, los aductos sodiados suelen presentar poca fragmentación, e irreproducible, en la celda de colisión, por lo que se estudió la adición de modificadores que pudieran favorecer la formación de otros aductos. Para ello se seleccionaron NH_4Ac y $LiAc$, los cuales permitieron obtener los iones correspondientes a la molécula protonada m/z 241, $[M+H]^+$, y al aducto m/z 247, $[M+Li]^+$, respectivamente. A continuación, se llevó a cabo la optimización de la fragmentación por colisión, así como la selección de los iones producto a fin de obtener las correspondientes transiciones SRM. Como puede verse en la *Figura 1* del artículo científico 4, los iones producto obtenidos a partir del precursor $[M+H]^+$ y $[M+Li]^+$ presentan mayor intensidad que los obtenidos a partir del precursor $[M+Na]^+$, tal como se esperaba.

Las transiciones optimizadas para $[M+H]^+$ (m/z 241) fueron 241>88, 241>120, 241>196 y 241>76, utilizando un voltaje de cono de 15 V y energías de colisión de 10, 15, 5 y 35 eV, respectivamente. En el caso de $[M+Li]^+$ (m/z 247) las transiciones optimizadas fueron 247>88, 247>120, 247>73 y 247>127, utilizando un voltaje de cono de 30 V y energías de colisión de 20, 15, 60 y 15 eV, respectivamente.

Para llevar a cabo la selección del modificador, escogiendo entre NH_4Ac y $LiAc$, se realizaron pruebas en cromatografía con los métodos SRM desarrollados para evaluar la

sensibilidad y reproducibilidad, y alcanzar un compromiso entre ambas. En principio se optimizaron las fases móviles y la concentración de modificador a añadir en cada caso. Como fases móviles se seleccionaron mezclas de H₂O/MeOH, siendo la cantidad óptima de modificador 0.1 mM para NH₄Ac y 0.05 mM para LiAc.

Seguidamente, se realizaron sucesivas inyecciones (n=5) de un mismo patrón de tiram (100 ng/mL) disuelto en acetona utilizando ambos métodos cromatográficos. Los resultados mostraron que en el caso de utilizar LiAc la respuesta media calculada fue 1.3 veces mayor que cuando se añade NH₄Ac, pero la RSD resultó 2.5 veces mayor, así que se consideró más adecuada la adición de 0.1 mM NH₄Ac a la fase móvil, ya que sólo suponía una reducción de la señal del 20%. En la Figura 4.2 se muestra un diagrama de estos resultados.

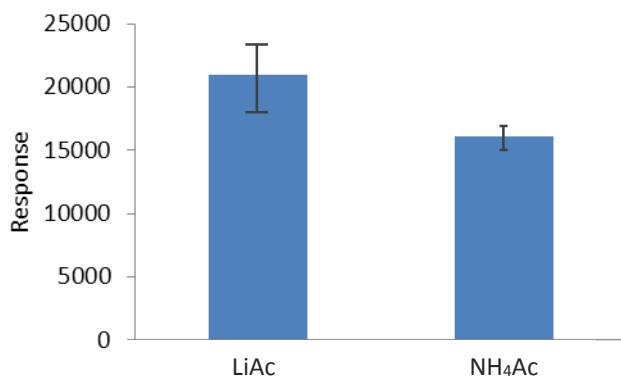


Figura 4.2. Resultados obtenidos (área tiram) obtenidos durante el estudio de selección de modificador de fase móvil

Optimización de la etapa de extracción

Teniendo en cuenta la conocida inestabilidad del tiram, en primer lugar se realizó un estudio de su estabilidad en solvente. Para ello, se prepararon disoluciones patrón en acetona, las cuales se almacenaron en frigorífico y en congelador. Al cabo de 12 días, los patrones almacenados en frigorífico se inyectaron junto con patrones recién preparados y se observó una importante pérdida de señal, como resultado de la degradación (aprox. 50%). En cambio, los que se encontraban almacenados en congelador se mantuvieron estables durante, al menos, 33 días, por lo que se les dio un periodo de validez de un mes.

A continuación, se procedió a la optimización de la etapa de extracción utilizando como matriz vegetal una muestra blanco de berenjena. Se consideraron como posibles disolventes de extracción, acetona y acetonitrilo. Se preparó un calibrado en matriz fortificando a diferentes concentraciones el extracto obtenido con cada disolvente, y se guardaron en congelador durante 5 días para evaluar la estabilidad del tiram en extractos de muestra. Para el calibrado obtenido a partir del extracto de acetona se observó una degradación del 70%, en cambio para el calibrado preparado a partir de acetonitrilo, el tiram permanecía estable. Por ello, se seleccionó acetonitrilo como disolvente de extracción.

Seguidamente, se realizaron ensayos de recuperación sobre muestra de berenjena fortificada a 0.1 mg/kg, realizando la extracción a diferentes tiempos después de fortificar: $t=0$, $t=1$ hora y $t=1$ día, todos ellos a temperatura ambiente. En ninguno de estos ensayos se obtuvieron resultados satisfactorios, ya que se observó degradación incluso en la muestra extraída inmediatamente después de fortificar.

Teniendo en cuenta los factores que pueden provocar la degradación del tiram (agua, actividad enzimática, pH y temperatura), se trató de controlarlos con el fin de mejorar los resultados obtenidos. En primer lugar, se añadió NaSO_4 anhidro para evitar la degradación por reacción con el agua de la matriz, lo cual provocó una leve mejora. A continuación, se trató de reducir la actividad enzimática añadiendo EDTA como agente complejante. Se evaluó el efecto de la adición de EDTA en dos concentraciones, 2 y 20 mM, en el extracto final, resultando más favorable la concentración más baja debido a que presentaba menor supresión de la respuesta (entre 15-20% menor) y recuperaciones similares. Aun así, las recuperaciones obtenidas no superaban el 65%. La Figura 4.3 muestra como ejemplo un patrón de 25 ng/mL preparado en matriz e inyectado con las dos concentraciones de EDTA ensayadas en el extracto final. Se puede observar que la señal obtenida en medio 2mM EDTA es ligeramente superior a la del medio 20 mM.

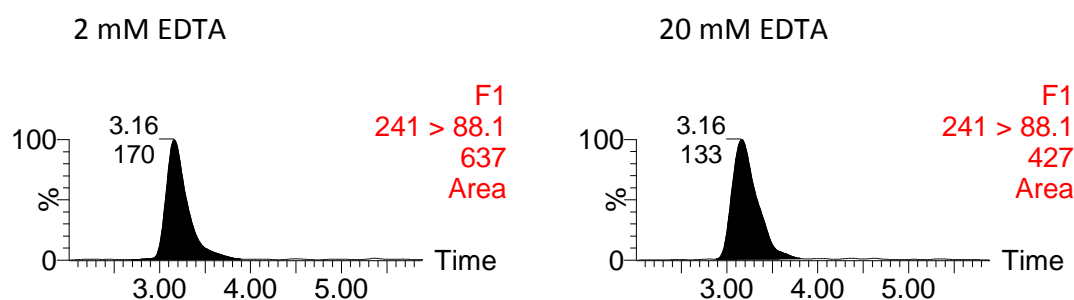


Figura 4.3. Efecto de la concentración de EDTA en el extracto final

Considerando que la reducción de la actividad enzimática mejoró en buena medida los resultados, el factor temperatura fue el siguiente que se evaluó ya que trabajar a baja temperatura es importante para reducir dicha actividad, a la vez que

proporciona unas condiciones en las que el tiram es más estable (Cajka, 2011). Se decidió realizar de forma simultánea la homogenización y extracción sobre la muestra congelada, manteniendo todo el material utilizado en un baño con hielo a una temperatura aproximada de 5°C. De esta manera, se consiguió que el conjunto de todos los factores evaluados, adición de NaSO₄ anhidro, EDTA y trabajo en condiciones de baja temperatura, llevara a recuperaciones satisfactorias (90%). La Figura 4.4 muestra los cromatogramas correspondientes a una muestra fortificada y el correspondiente patrón del calibrado matriz a temperatura ambiente (izda) y a 5°C (dcha).

De este modo, el procedimiento optimizado consistió en la extracción directa de la muestra congelada con acetonitrilo en presencia de NaSO₄ anhidro y EDTA. El extracto obtenido se analizó sin ningún tratamiento adicional mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem.

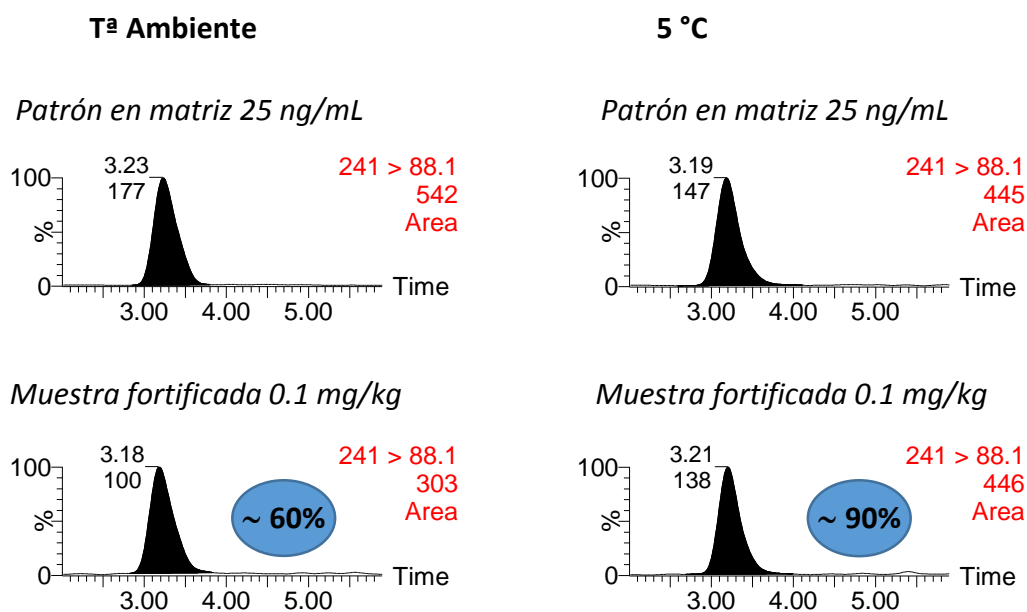


Figura 4.4. Comportamiento de la recuperación del tiram en función de la temperatura de extracción

El procedimiento desarrollado se aplicó a otras matrices vegetales, como lechuga y fresa. En el caso de lechuga, los resultados obtenidos fueron satisfactorios, pero en la fresa las recuperaciones no superaron el 40%. La fresa es una matriz ácida, por lo que su bajo pH es otro de los factores que pueden provocar degradación del tiram. Además, la eliminación del agua durante la homogenización resultó más problemática que en lechuga. Se decidió aumentar al doble la cantidad de NaSO_4 anhidro para que la eliminación del agua fuese más efectiva y, a su vez, modificar el procedimiento añadiendo un agente básico que disminuyera la acidez del extracto. Para ello, se evaluó la adición de NaHCO_3 y Na_2CO_3 durante la homogenización/extracción de manera que la concentración final en extracto fuese de aproximadamente 200 mM para ambos. Los resultados mostraron que el Na_2CO_3 no evitaba la degradación, pero en cambio el

NaHCO₃ permitió preservar al tiram durante el proceso y obtener así resultados satisfactorios también para la fresa

Validación y análisis de muestras

Una vez optimizadas las condiciones de trabajo se llevó a cabo la validación de los métodos desarrollados de acuerdo con las guías SANCO (European Commission, 2000, European Commission, 2010) en muestras de berenjena, lechuga y fresa a los niveles 0.01 y 0.1 mg/kg. Los resultados obtenidos en cuanto a linealidad, precisión, exactitud y especificidad fueron excelentes. Cabe destacar el diferente comportamiento en cuanto a linealidad en fresa, ya que en este caso los datos se ajustaron a una ecuación de segundo grado mientras que en berenjena y lechuga se pudo utilizar una ecuación de primer grado. El LOQ se estableció como el nivel más bajo validado, es decir, 0.01 mg/kg. Adicionalmente, a fin de resaltar la sensibilidad del método, se calculó el LOQ estadístico como la concentración de tiram que produce una señal de 10 veces el ruido de fondo en el cromatograma correspondiente a la transición de cuantificación del punto más bajo del calibrado. Los valores calculados fueron 0.4, 2 y 4 µg/kg para berenjena, lechuga y fresa, respectivamente. Del mismo modo, se calculó el LOD como la concentración de tiram correspondiente a una relación señal/ruido de 3 en el cromatograma del nivel bajo del calibrado. Este cálculo se realizó también para las transiciones de confirmación definiendo así el límite de confirmación (LOC) para cada una de ellas. En la *Tabla 2 del artículo científico 4* se muestra un resumen de los resultados obtenidos. En ella puede verse que se lograron alcanzar niveles muy bajos de concentración, estimados a partir de LOD y LOC para las transiciones seleccionadas, permitiendo ampliamente la aplicación de la metodología desarrollada para el cumplimiento de los LMR establecidos.

Las características analíticas demostraron la robustez y sensibilidad del método desarrollado, que además, presentó una gran mejora respecto al trabajo publicado por Blasco y colaboradores (Blasco, 2004), en el que se establecía un LOQ de 2.5 mg/kg, que es 250 veces mayor que el LOQ establecido en el presente trabajo.

La aplicabilidad del método desarrollado ha quedado demostrada tras analizar 4 muestras de berenjena, en las que el tiram se aplicó mediante goteo en campo, y 3 muestras de lechuga y fresa, en las que el tiram se aplicó como fungicida post-cosecha. Adicionalmente, en cada secuencia de análisis se incluyeron dos muestras control (QC) a los niveles de concentración validados para asegurar la fiabilidad de los resultados obtenidos. Únicamente se encontraron residuos de tiram en una muestra de lechuga (0.13 mg/kg). Respecto a la confirmación de la presencia de tiram en la muestra, la adquisición de 4 transiciones y el correspondiente cálculo de las Q/q ratio y sus desviaciones, permitió asegurar su identidad. En la *Figura 3 del artículo científico 4*, pueden verse los cromatogramas correspondientes a la muestra de lechuga positiva, el QC a 0.1 mg/kg y el correspondiente punto del calibrado matriz, incluyendo en cada caso el valor Q/q calculado y su desviación.

Finalmente para extender la aplicabilidad del método desarrollado en berenjena y lechuga, se analizaron 2 muestras comerciales de manzana incluyendo en la secuencia de análisis dos QCs a 0.01 y 0.1 mg/kg preparados con muestra blanco de manzana fortificada a dichos niveles. De esta forma, se pretendía demostrar que la metodología desarrollada también podría ser aplicable a otras matrices vegetales. Se observó que, al igual que en berenjena y lechuga, la ecuación correspondiente al calibrado matriz se ajustaba a una ecuación de primer orden. Por otro lado, las recuperaciones calculadas para los QCs fueron muy buenas. Así pues, se demostró la aplicabilidad del método

desarrollado a otras matrices vegetales. En este caso, tampoco se encontraron residuos en las muestras comerciales. La Figura 4.5 muestra los cromatogramas correspondientes a una de las muestras de manzana analizadas junto con el QC a nivel bajo (0.01 mg/Kg) y el correspondiente punto del calibrado matriz (2.5 ng/mL).

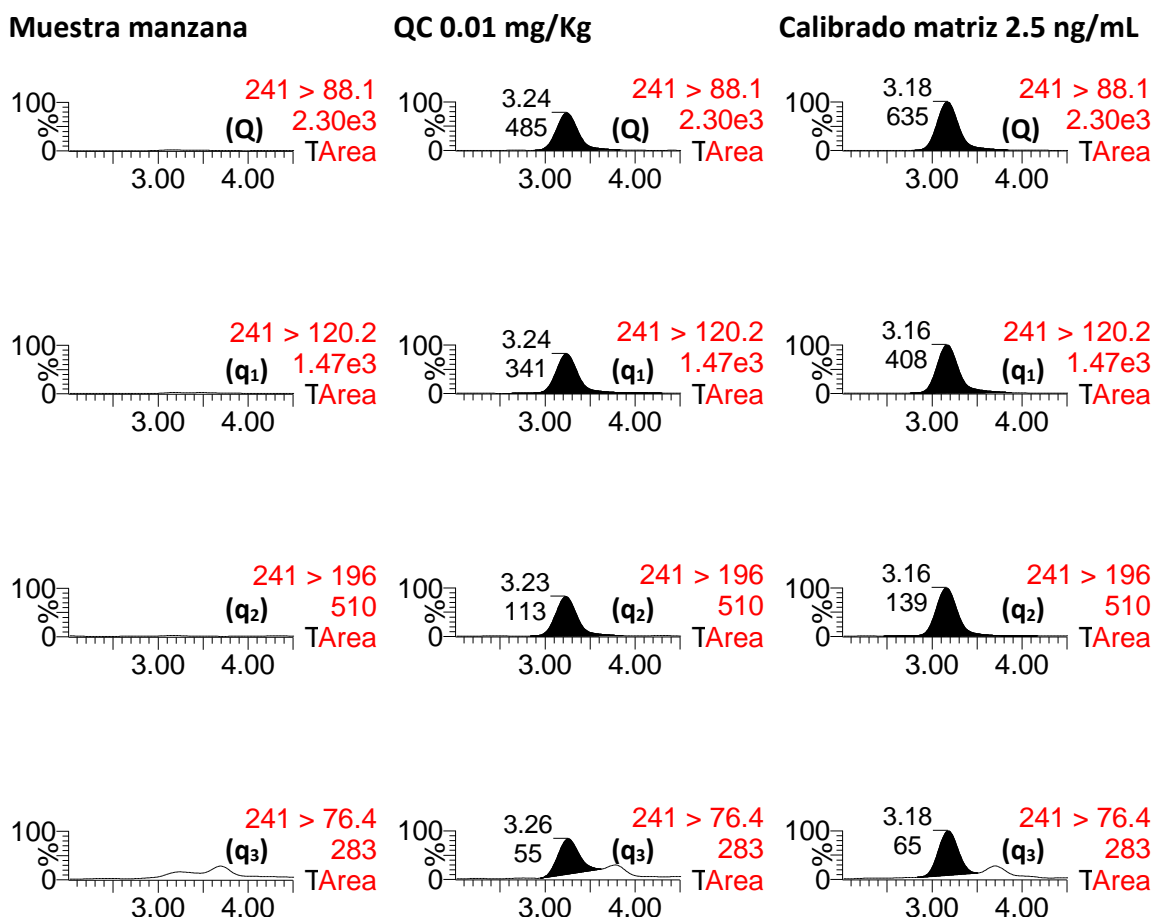


Figura 4.5. Cromatogramas representativos del análisis de muestras de manzana

Como conclusión, cabe destacar que se ha desarrollado y validado metodología analítica moderna y avanzada para la cuantificación e identificación de residuos de

tiram en frutas y vegetales alcanzando niveles muy bajos de concentración (del orden de 0.01 mg/Kg, e incluso inferiores), que permite su aplicación para la vigilancia del cumplimiento de los LMRs establecidos en la UE, calculando la concentración como tiram y no en base a su producto de degradación, CS₂. La cuidadosa optimización del proceso de extracción permitió evitar la degradación del tiram durante el tratamiento de muestra. Además, la aplicación de la técnica LC-MS/MS permitió la adquisición de hasta cuatro transiciones SRM que aseguraron la correcta e inequívoca confirmación de su identidad en muestras reales.

La metodología desarrollada constituye un gran avance, respecto a los métodos analíticos publicados hasta la fecha, en cuanto a la determinación individual de tiram en muestras vegetales.

CAPITULO 4.2

DETERMINACIÓN INDIVIDUAL DE RESIDUOS DE PIRETRINAS EN FRUTAS Y VEGETALES POR LC-MS/MS

4.2.1. INTRODUCCIÓN

La agricultura ecológica es un sistema de gestión agrícola en la que el cultivo se realiza únicamente a partir de recursos naturales, sin utilizar productos químicos sintéticos ni organismos modificados genéticamente en la prevención de plagas o como abonos. El objetivo principal es la obtención de alimentos de calidad nutritiva y libres de productos químicos sintéticos, respetando la actividad biológica del suelo y el medio ambiente. Hoy en día la mayor conciencia respecto a la salud y el medio ambiente ha provocado un aumento en el consumo de este tipo de productos, llamados ecológicos o biológicos. Una situación intermedia entre la agricultura convencional, con aplicación de productos químicos (plaguicidas, abonos), y la agricultura biológica/ecológica, es el control integrado de plagas, donde está permitido el uso de ciertos plaguicidas pero sólo en caso estrictamente necesario y reduciendo al mínimo su aplicación combinando diversos medios de lucha contra las plagas (control biológico, cuidado de la tierra con técnicas manuales, etc). El Reglamento Europeo (CE) No 889/2008 (Regulation (EC) No 889/2008) sobre producción y etiquetado de los productos ecológicos, establece las normas sobre la producción ecológica, etiquetado y control, teniendo en cuenta cómo gestionar la presencia de plagas, enfermedades y malas hierbas mediante la aplicación de ciertos plaguicidas y productos fitosanitarios, la mayoría de origen natural, entre los cuales se encuentran las piretrinas.

Las piretrinas son una mezcla de seis compuestos naturales con propiedades insecticidas que se extraen de las flores de la familia del crisantemo. Los componentes de las piretrinas se clasifican en dos grupos: Piretrinas I, formado por tres ésteres derivados del ácido crisantémico (piretrina I, cinerín I y jasmolín I) y Piretrinas II, formado por tres ésteres derivados del ácido pirétrico (piretrina II, cinerín II y jasmolín II). La

acción insecticida de ambos grupos es diferente, las piretrinas I son tóxicas y tienen un efecto letal, en cambio las piretrinas II tienen efecto “derribo” provocando parálisis muscular. La combinación de ambos grupos resulta muy eficaz contra gran variedad de insectos. La proporción entre ambos grupos depende del tipo de planta, región, clima y periodo de cultivo, normalmente oscila entre 0.9 y 1.3 (Grdisa, 2013). La proporción entre las piretrinas I y II determina la calidad del extracto, ya que los insectos pueden metabolizar las piretrinas II y recuperarse de su efecto en pocas horas. Durante el periodo de maduración de la planta, las piretrinas I pueden sufrir transformación bioquímica en piretrinas II, viéndose disminuidas tanto su proporción como la acción insecticida (Angioni, 2005). Una vez obtenido el extracto de piretrinas de la planta, la degradación tanto de piretrinas I como II es rápida lo cual puede resultar problemático ya que en ocasiones se almacenan durante periodos largos antes de procesarse y generar el producto comercial. Atkinson et al. (Atkinson, 2004) realizaron un estudio de las condiciones óptimas de almacenamiento, considerando diversos factores como temperatura, presencia de humedad y oxígeno, degradación microbiana e incluso se evaluó cómo la propia planta protege a las piretrinas cuando éstas aún no han sido extraídas. Las conclusiones del trabajo mostraron que el principal factor de degradación a nivel ambiental es la temperatura, por lo que mantener una baja temperatura durante el almacenamiento previene la degradación. Por otro lado, se confirmó que la estructura de la planta proporciona protección física y química a las piretrinas.

El uso de las piretrinas en hogares y jardines es amplio debido a su buena eficacia a bajas dosis frente a gran variedad de insectos. En agricultura, la rápida degradación que experimentan en condiciones de campo constituye una ventaja y un inconveniente,

ya que se produce un bajo impacto medioambiental pero se requieren aplicaciones frecuentes para asegurar su efectividad. La adición de un agente sinergista, como el butóxido de piperonil, junto con el producto formulado, proporciona mayor estabilidad e inhibe su degradación (Woudneh, 2006): Sin embargo, su uso no está autorizado en agricultura ecológica.

De acuerdo con la legislación europea (Regulation (EC) No 396/2005), los límites máximos de residuos para piretrinas en productos de origen vegetal y animal se definen como la suma de ambos grupos, piretrinas I y II. En el caso de muestras vegetales los valores para los LMRs varían entre 0.5 y 3 mg/kg, mientras que en matrices de origen animal el LMR es de 0.05 mg/kg. Para llevar a cabo la correcta cuantificación, se requieren métodos de análisis individual para los seis componentes, específicos y sensibles con el fin de asegurar la correcta cuantificación en las muestras.

Los primeros métodos reportados sobre la determinación individual de los seis componentes de las piretrinas en muestras vegetales se basan en el uso de cromatografía líquida acoplada a un detector de barrido de diodos, lo cual no resulta adecuado en análisis a nivel de residuos, por su falta de sensibilidad y de información que asegure la correcta identificación de los compuestos detectados. Por ello, se requiere el uso adicional de espectrometría de masas para confirmar la identificación de cada analito (Angioni, 2005; Caboni, 2007; Caboni, 2005).

El acoplamiento LC-MS/MS ha permitido el desarrollo de métodos individuales en diversas matrices, como alimentos y suelos (Chung, 2012; Lu, 2010; Prestes, 2012; Ruiz, 2011, Romero, 2011), gracias a las excelentes prestaciones que ofrece en el análisis de residuos de plaguicidas. En la mayoría de estos trabajos se han desarrollado métodos LC-MS/MS basados en el procedimiento QuEChERS, resultando satisfactoria sensibilidad

y selectividad. Aun así, el número de métodos individuales publicados es muy escaso y las matrices vegetales estudiadas han sido muy pocas (arroz, mostaza, huevo, te, limón, albaricoque, trigo, pepino y vino tinto).

En este trabajo se propone un método de análisis individual de piretrinas en vegetales basado en LC-MS/MS (*artículo científico 5*). El objetivo principal es desarrollar un método robusto y rápido capaz de asegurar tanto la cuantificación como la identificación de cada componente de las piretrinas en numerosas matrices vegetales. Para ello, se han seleccionado diversos grupos, tal y como se establece en las guías europeas (OECD, 2007; European Commission, 2010): matrices con alto contenido en agua (lechuga, pimiento, pepino y tomate); alto contenido ácido (fresa); alto contenido en grasa (pistacho); alto contenido en almidón y proteínas (arroz y patata); y matrices secas (arroz). Así mismo, se pretende conseguir un método que se adecúe a los LMRs comunitarios, en cuanto a sensibilidad, de modo que pueda ser aplicado para el control del cumplimiento de dichos LMRs.

4.2.2. ARTÍCULO CIENTÍFICO 5

Development of a fast analytical method for the individual determination of pyrethrins residues in fruits and vegetables by liquid chromatography–tandem mass spectrometry

Aranzazu Peruga, Carmen Hidalgo, Juan V. Sancho, Félix Hernández

Journal of Chromatography A (2013) 1307: 126–134

Journal of Chromatography A, 1307 (2013) 126–134

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chroma

Development of a fast analytical method for the individual determination of pyrethrins residues in fruits and vegetables by liquid chromatography–tandem mass spectrometry

Aranzazu Peruga, Carmen Hidalgo, Juan V. Sancho, Félix Hernández*

Research Institute for Pesticides and Water, University Jaume I, E-12071 Castellón, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
Received 4 June 2013
Received in revised form 22 July 2013
Accepted 23 July 2013
Available online 31 July 2013

Keywords:
Liquid chromatography
Tandem mass spectrometry
Pyrethrins
Residues
Fruits and vegetables

ABSTRACT

Pyrethrins are natural insecticides derived from chrysanthemum flowers containing a mixture of six components: pyrethrin I, cinerin I, jasmolin I, pyrethrin II, cinerin II, and jasmolin II. In this work, a rapid and sensitive LC–(ESI)–MS/MS method has been developed for the individual quantification and confirmation of pyrethrin residues in fruit and vegetable samples by monitoring two specific transitions for each pyrethrin component under Selected Reaction Monitoring (SRM) mode. Samples were extracted with acetone/water or acetone, depending on the sample type, and raw extracts were directly injected in the LC–MS/MS system. Method validation was carried out evaluating linearity, accuracy, precision, specificity, limit of quantification (LOQ) and limit of detection (LOD) in eight types of fruit and vegetable samples at 0.05 mg/kg and 0.5 mg/kg (referred to the sum of all pyrethrins). The method based on acetone/water (70:30) extraction led to satisfactory recoveries (70–110%) and good precision (below 14%) for all pyrethrin components in lettuce, pepper, strawberry and potato. The method based on acetone extraction allowed satisfactory recoveries for lettuce, cucumber, tomato and rice samples with recoveries between 71 and 107% and RSDs below 15%. For pistachio samples, satisfactory results were obtained only for some analytes and extracts were also injected using APCI interface, but the lower sensitivity achieved allowed only the validation at 0.5 mg/kg. The analytical methodology developed was applied to the analysis of fruit and vegetable samples.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Pyrethrins are natural insecticides derived from chrysanthemum flowers, consisting on a mixture of three closely related insecticidal esters of chrysanthemic acid (Pyrethrins I) and the three corresponding esters of pyrethric acid (Pyrethrins II). The three components of Pyrethrins I (pyrethrin I, cinerin I, and jasmolin I) and the components of Pyrethrins II (pyrethrin II, cinerin II, and jasmolin II) made that pyrethrins consist on a mixture of six individual compounds [1]. The ratio between these two groups is affected by the plant type, the region where the plants grow, and the period of harvest. This ratio is important because the action against insects differs: pyrethrins I have a lethal effect, and pyrethrins II have a knockdown effect [2].

Pyrethrins have been used for insect control since ancient times. Their principal uses are as household and livestock insecticides, post-harvest insecticides for grain and pest control in fruit and vegetables prior to harvest. Moreover, they are allowed in organic production according to Regulation (EC) No. 889/2008 [3]; the use of pyrethrins in this field is high due to their efficiency to control insects at low doses [4]. Maximum residue levels (MRLs) for pyrethrins in food and feed of plant and animal origin are established in Regulation (EC) No. 396/2005 [5]. Residue definition is the sum of pyrethrins I and pyrethrins II, and validated methods should exist to determine individually all six components of pyrethrins. Therefore, specific and sensitive methods for individual pyrethrins are required. For the matrices evaluated in this paper (lettuce, tomato, cucumber, strawberry, pepper, potato, rice, and pistachio), MRLs, referred to the sum of pyrethrins, are 1 mg/kg, except for rice which is 3 mg/kg.

Despite pyrethrins have high efficiency against a variety of insects, their rapid degradation in the environment, mainly due to sunlight, has stimulated over the last decades the research for synthetic derivatives. Synthetic pyrethrins, called pyrethroids, have led to a series of broad-spectrum insecticides with enhanced activity and higher persistency than natural pyrethrins. Nowadays, there is still confusion between the terms pyrethrins and pyrethroids [6,7], despite they are belonging to different families of compounds.

Pyrethrins have been analyzed both by GC [8–10] and LC [2,4,11–15]. In the case of GC, sample treatment is often laborious,

Development of a fast analytical method for the individual determination of pyrethrins residues in fruits and vegetables by liquid chromatography–tandem mass spectrometry

Journal of Chromatography A (2013) 1307: 126–134

Aranzazu Peruga, Carmen Hidalgo, Juan V. Sancho, Félix Hernández

Research Institute for Pesticides and Water, University Jaume I, E-12071 Castellón, Spain

Received 4 June 2013; Revised 22 July 2013; Accepted 23 July 2013; Available online 31 July 2013. DOI: 10.1016/j.chroma.2013.07.090

ABSTRACT

Pyrethrins are natural insecticides derived from chrysanthemum flowers containing a mixture of six components: pyrethrin I, cinerin I, jasmolin I, pyrethrin II, cinerin II, and jasmolin II. In this work, a rapid and sensitive LC–(ESI)–MS/MS method has been developed for the individual quantification and confirmation of pyrethrin residues in fruit and vegetable samples by monitoring two specific transitions for each pyrethrin component under Selected Reaction Monitoring (SRM) mode. Samples were extracted with acetone/water or acetone, depending on the sample type, and raw extracts were directly injected in the LC–MS/MS system. Method validation was carried out evaluating linearity, accuracy, precision, specificity, limit of quantification (LOQ) and limit of detection (LOD) in eight types of fruit and vegetable samples at 0.05 mg/kg and 0.5 mg/kg (referred to the sum of all pyrethrins). The method based on acetone/water (70:30) extraction led to satisfactory recoveries (70–110%) and good precision (below 14%) for all pyrethrin components in lettuce, pepper, strawberry and potato. The

method based on acetone extraction allowed satisfactory recoveries for lettuce, cucumber, tomato and rice samples with recoveries between 71 and 107% and RSDs below 15%. For pistachio samples, satisfactory results were obtained only for some analytes and extracts were also injected using APCI interface, but the lower sensitivity achieved allowed only the validation at 0.5 mg/kg. The analytical methodology developed was applied to the analysis of fruit and vegetable samples.

Highlights

- We develop a specific analytical methodology for the determination of individual pyrethrins in fruits and vegetables.
- The method is based on LC–MS/MS using ESI and APCI interfaces.
- Two specific SRM transitions are monitored for each pyrethrin component.
- The excellent sensitivity and selectivity of the method allows monitoring for compliance of MRLs.

Keywords

Liquid chromatography; Tandem mass spectrometry; Pyrethrins; Residues; Fruits and vegetables

* Corresponding author. Tel.: +34 964 387366; fax: +34 964 387368. *E-mail address:* felix.hernandez@qfa.uji.es (F. Hernández).

1. Introduction

Pyrethrins are natural insecticides derived from chrysanthemum flowers, consisting on a mixture of three closely related insecticidal esters of chrysanthemic acid (Pyrethrins I) and the three corresponding esters of pyrethric acid (Pyrethrins II). The three components of Pyrethrins I (pyrethrin I, cinerin I, and jasmolin I) and the components of Pyrethrins II (pyrethrin II, cinerin II, and jasmolin II) made that pyrethrins consist on a mixture of six individual compounds [1]. The ratio between these two groups is affected by the plant type, the region where the plants grow, and the period of harvest. This ratio is important because the action against insects differs: pyrethrins I have a lethal effect, and pyrethrins II have a knockdown effect [2].

Pyrethrins have been used for insect control since ancient times. Their principal uses are as household and livestock insecticides, post-harvest insecticides for grain and pest control in fruit and vegetables prior to harvest. Moreover, they are allowed in organic production according to Regulation (EC) No. 889/2008 [3]; the use of pyrethrins in this field is high due to their efficiency to control insects at low doses [4]. Maximum residue levels (MRLs) for pyrethrins in food and feed of plant and animal origin are established in Regulation (EC) No. 396/2005 [5]. Residue definition is the sum of pyrethrins I and pyrethrins II, and validated methods should exist to determine individually all six components of pyrethrins. Therefore, specific and sensitive methods for individual pyrethrins are required. For the matrices evaluated in this paper (lettuce, tomato, cucumber, strawberry, pepper, potato, rice, and pistachio), MRLs, referred to the sum of pyrethrins, are 1 mg/kg, except for rice which is 3 mg/kg.

Despite pyrethrins have high efficiency against a variety of insects, their rapid degradation in the environment, mainly due to sunlight, has stimulated over the last

decades the research for synthetic derivatives. Synthetic pyrethrins, called pyrethroids, have led to a series of broad-spectrum insecticides with enhanced activity and higher persistency than natural pyrethrins. Nowadays, there is still confusion between the terms pyrethrins and pyrethroids [6, 7], despite they are belonging to different families of compounds.

Pyrethrins have been analyzed both by GC [8–10] and LC [2, 4, 11–15]. In the case of GC, sample treatment is often laborious, and after extraction a clean-up step is usually required. GC coupled to tandem MS has proved to be an advantageous and powerful technique for the determination of pesticides in vegetable samples [16]. However, for pyrethrins the use of EI or even CI ionization leads to common fragments of these compounds, which difficult their identification and lead to quantification only as total pyrethrins.

Most of analytical methods reported for individual determination of pyrethrins components are based on liquid chromatography (LC) coupled to a low selective detector such as UV [2, 4, 12, 13, 17, 18], which is not satisfactory for residue levels. In a few cases, atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry (APCI-MS) was used in order to ensure accurate identification of individual pyrethrins [4, 12]. Thus, Caboni et al. [12] developed a multiresidue method for botanical insecticides on fruits and vegetables. LOQs referred to as total content of pyrethrins were 0.05 mg/kg for pyrethrins I and II, and 0.1 mg/kg for cinerin and jasmolin I and II series.

LC coupled to tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) is a powerful technique that provides excellent selectivity and sensitivity, allowing the reliable identification and quantification of the analytes. The acquisition of at least two specific transitions working

under Selected Reaction Monitoring (SRM) mode leads to a reliable confirmation of the identity of the analyte detected in the sample [19].

LC–MS/MS is nowadays the technique for most pesticides and has become the workhorse in pesticide residue analysis. However, a few LC–MS/MS methods have been reported for pyrethrin residues in foods [11, 20–22] and soils [23]. Lu et al. [11] developed a method for determination of pyrethrin residues in tea samples by ultrahigh-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UHPLC–MS/MS). Results obtained were satisfactory, with LOQs below 0.05 mg/kg, which allows the application of the method in compliance with MRL established by the European Union Commission for tea matrices. Ruiz et al. [20] reported a QuEChERS methodology for the determination of pyrethrins in lemon and apricot using HPLC–MSD trap system.

Taking into account the generalized lack of LC–MS/MS analytical methodology for individual pyrethrins in fruits and vegetables, the aim of this work is to develop a rapid, reliable and sensitive LC–MS/MS method for the specific quantification and identification of pyrethrin components in a notable number of fruit and vegetable samples, covering the four matrix groups included in SANCO/825/00 rev.8.1 guideline [24], which includes dry, high water, high oil and high acid content commodities, in order to cover the registration requirements for these natural pesticides according to European Union.

2. Materials and methods

2.1. Reagents and chemicals

Pyrethrin reference standard (pyrethrins technical mixture) was purchased from Dr Ehrenstorfer (Augsburg, Germany) with a certified content of 12% pyrethrin I (pyr I), 9% pyrethrin II (pyr II), 1% cinerin I (cin I), 2% cinerin II (cin II), 2% jasmolin I (jas I), and 1% jasmolin II (jas II). HPLC-grade methanol, residue analysis acetone and reagent grade ammonium acetate were purchased from ScharLab (Barcelona, Spain). LC-grade water was obtained by purifying demineralized water in a Milli-Q Gradient A10 (Millipore, Billerica, MA, USA).

Stock standard solution of pyrethrins was prepared dissolving 200 mg powder, accurately weighed, in 100 mL acetone obtaining a final concentration of 240 g/mL for pyr I, 180 g/mL for pyr II, 20 g/mL for cin I and jas II, 40 g/mL for cin II and jas I (around 500 g/mL for the sum of all pyrethrins), which was stored at -20°C . Working solutions, used for LC–MS/MS analysis or for sample fortification, were obtained by diluting stock solution with acetone and stored also at -20°C .

2.2. Instrumentation

An HPLC system Waters Alliance 2695 (Waters, Milford, MA, USA) was interfaced to a Quattro micro triple quadrupole mass spectrometer (Waters) using two different interfaces, orthogonal Z-spray-electrospray interface (ESI) and Ion Sabre atmospheric-pressure chemical ionization (APCI).

In the case of ESI, the LC separation was performed by injecting 20 μL of sample in a Discovery C18 column (50 mm \times 2.1 mm i.d., 5 μm) (Supelco, Bellefonte, PA, USA), at

a flow rate of 200 $\mu\text{L}/\text{min}$. The mobile phase used was water at 0.1 mM ammonium acetate–methanol gradient where the percentage of methanol was changed linearly as follows: 0 min, 30%; 1 min, 30%; 4 min, 95%; 9 min, 95%, 9.1 min, 30%. Desolvation and cone gas flows were selected to 600 L/h and 60 L/h, respectively. Infusion experiments were performed using the built-in syringe pump, directly connected to the interface. Capillary voltages of 3.5 kV were used in positive ionization mode. The interface temperature was set to 350°C and the source temperature to 120°C.

In the case of APCI, the LC separation was performed by injecting 20 μL of sample in a Discovery C18 column (50 mm \times 2.1 mm i.d., 5 μm) (Supelco, Bellefonte, PA, USA), at a flow rate of 300 $\mu\text{L}/\text{min}$. The mobile phase used was water-methanol gradient where the percentage of methanol was changed linearly using the same gradient as that employed for ESI. The desolvation and cone gas were set at 600 L/h and 60 L/h, respectively. Infusion experiments were performed using the Alliance 2695 at a flow rate of 1 mL/min. The current intensity in the corona pin was selected as 10 A. The source temperature was selected as 120°C and probe temperature was set at 400°C.

Drying gas as well as nebulizing gas was nitrogen generated from pressurized air in a high purity nitrogen generator NM30LA 230Vac Gas Station from Peak Scientific (Inchinnan, Scotland). For operation in MS/MS mode, collision gas was Argon 99.995% (Praxair, Valencia, Spain) with a pressure of 3×10^{-3} mbar in the collision cell.

Dwell times of 0.1 s were chosen for each transition. Two solvent delays were selected to give an additional clean-up using the built-in divert valve controlled by the Masslynx NT v.4.1 software, the first one from 0 to 6 min, and the second one from 9 to 15 min. The quantification (Q) and confirmation (q) transitions are shown in Table 1, which optimized at cone voltage of 25 or 20 V for ESI and APCI, respectively, and collision

energy of 10 (Q), and 20 (q) eV for all compounds (**Table 1**). The application manager TargetLynx was used to process the quantitative data obtained from calibration standards and from crop samples.

2.3. Recommended procedure

10 g of sample (5 g in the case of rice and pistachio) were accurately weighed, and 40 mL of extraction solvent were added. Extraction was carried out by high speed blending for 2 min in an IKA Labortechnik homogenizer model T25 (IKA® -Werke GmbH & Co, Staufen, Germany); after that, the extract was filtered and adjusted to 50 mL with extraction solvent and centrifuged at 4500 rpm during 10 min. Finally, 20 µL of extract were directly injected in the LC–MS/MS system. Quantification was made by matrix-matched calibration.

Table 1. MS/MS optimized conditions for individual pyrethrins.

Compound	Precursor ion (m/z)	Cone (V) ESI/APCI	Product Ion (m/z)	Fragment	Collision (eV)	Product Ion (m/z)	Fragment	Collision (eV)	Q/q ratio*
Pyrethrin I	329.3	25 / 20	161.2	C ₁₁ H ₁₃ O	10	133.1	C ₉ H ₉ O	20	3.60 (7)
Pyrethrin II	373.2	25 / 20	161.2	C ₁₁ H ₁₃ O	10	133.1	C ₉ H ₉ O	20	3.30 (8)
Cinerin I	317.3	25 / 20	149.2	C ₁₀ H ₁₃ O	10	107.1	C ₇ H ₇ O	20	1.12 (5)
Cinerin II	361.2	25 / 20	149.2	C ₁₀ H ₁₃ O	10	107.1	C ₇ H ₇ O	20	1.16 (8)
Jasmolin I	331.3	25 / 20	163.2	C ₁₁ H ₁₅ O	10	107.1	C ₇ H ₇ O	20	2.16 (12)
Jasmolin II	375.2	25 / 20	163.2	C ₁₁ H ₁₅ O	10	107.1	C ₇ H ₇ O	20	2.20 (14)

*Average value for matrix-matched standards of all matrices studied (RSD (%) in brackets).

A mixture of acetone/water (70:30) was satisfactory as extraction solvent for lettuce, pepper, strawberry and potato. On the other hand, acetone (100%) gave

satisfactory results as extraction solvent for lettuce, cucumber, tomato, rice and pistachio. Dry matrices, such as rice, required hydration prior to extraction so 5 mL of water were added and allowed to stand for 5 min before acetone addition and extraction.

Fortification of samples for recovery experiments was performed by delivering 1 mL of pyrethrins standard solution (at 0.5 or 5 µg/mL in acetone, referred to the sum of pyrethrins) to 10 g of sample in order to obtain 0.05 and 0.5 mg/kg fortification level, respectively. In the case of rice and pistachio, 0.5 mL of pyrethrins standard solution, at the concentrations indicate above, were added to 5 g of sample in order to achieve the same fortification levels as in the other matrices. Fortified samples were allowed to stand for 1 h before extraction.

2.4. Validation study

Statistical validation of the developed method was performed on the basis of the European SANCO guidelines [24–26] in eight types of fruit and vegetable samples (lettuce, cucumber, tomato, pepper, strawberry, potato, rice and pistachio). Linearity, accuracy, precision, specificity, limit of quantification (LOQ) and limit of detection (LOD) were the analytical characteristics evaluated.

The matrix-matched calibration curve was performed by analyzing, in triplicate, 6 matrix-matched standard solutions at concentrations between 5 and 250 ng/mL. Matrix-matched standards were prepared from blank samples that were extracted accordingly to the sample preparation procedure. After extraction, an aliquot of the blank raw extract was transferred to a 10 mL volumetric flask, and 1 mL of the corresponding mixed standard solution was added. Volume was adjusted to 10 mL with the blank raw extract.

Accuracy of the method was estimated by means of recovery experiments performed on samples spiked at two levels (0.05 and 0.5 mg/kg, referred to the sum of pyrethrins). All experiments were carried out with 5 replicates. Precision of the method (repeatability) was evaluated within the same day at each recovery level, and it was calculated in terms of relative standard deviation (RSD) for 5 replicates.

The LOQ objective was established as the lowest concentration level that was fully validated using the overall analytical procedure, with satisfactory recovery (70–110%) and precision (RSD<20%).

The specificity was tested by analyzing a procedure blank, a sample blank and a sample blank spiked with pyrethrins at the objective LOQ level. The response should not exceed 30% the LOQ signal to consider the method to have satisfactory specificity.

The validation parameters were tested with the two selected transitions for each pyrethrin component according to SANCO/825/00 rev. 8.1 [24] requirements.

In order to have an estimation of the method sensitivity, in addition to the LOQ objective, statistical limit of detection (LOD) and LOQ were also estimated. They were calculated, for a signal-to-noise of 3 and 10, respectively, from the chromatograms corresponding to the quantitative transitions at the lowest point of the matrix-matched standards calibration.

2.5. Confirmation of positive samples

Q/q ratios, defined as the ratios between the intensity of the quantification transition (Q) and the confirmation transition (q), were used to confirm the peak identity in samples. First, the theoretical Q/q ratio was calculated as the mean value for the

standard solutions injected in the linearity study (i.e. matrix-matched standards) (Table 1). To confirm a finding as an actual positive, experimental Q/q ratios should fit the theoretical Q/q ratios within the maximum tolerance admitted, which depends on the Q/q ratio value [27]: 20% for Q/q ratios lower than 2; 25% between 2 and 5; 30% between 5 and 10; and 50% for Q/q ratios higher than 10.

3. Results and discussion

3.1. MS conditions optimization

Positive electrospray full scan and MS/MS spectra, in the presence of different additives, were obtained from infusion of 5 µg/mL (sum of pyrethrins) standard solution (50:50 methanol:water) at a flow rate of 10 µL/min. The full scan mass spectrum was dominated by six peaks at m/z 351, 395 (Pyr I, Pyr II), 339, 383 (Cin I, Cin II), 353, and 397 (Jas I, and Jas II) corresponding to $[M+Na]^+$ adducts (Fig. 1, top). In order to minimize the abundance of these adducts the use of HCOOH and ammonium acetate as additives was tested. The addition of HCOOH did not produce any change in the spectrum (Fig. 1, middle), while ammonium acetate removed $[M+Na]^+$ adducts from the spectrum resulting in the formation of $[M+H]^+$ ions at m/z 329, 373 (Pyr I, Pyr II), 317, 361 (Cin I, Cin II), 331, and 375 (Jas I, Jas II) (Fig. 1, bottom).

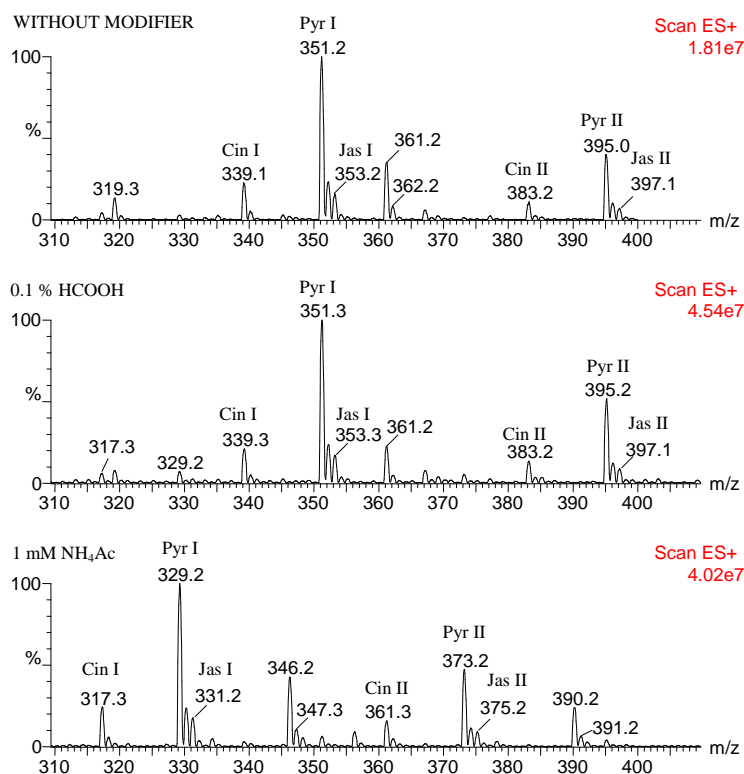


Fig. 1. Positive ion electrospray full scan mass spectra of pyrethrins acquired by infusion of 5 g/mL standard solution (referred to the sum of all compounds) with different additives at 20 V cone voltage: (top) without additive, (middle) 0.1% HCOOH, (bottom) 1 mM NH₄ OAc

For each pair of pyrethrins (Pyr, Cin and Jas), the same two main product ions were observed in MS/MS experiments when selecting $[M+H]^+$ as precursor ion: m/z 161 and 133 for Pyr I and Pyr II, m/z 149 and 107 for Cin I and Cin II, m/z 163 and 107 for Jas I and Jas II (**Fig. 2**). Because of the similarity from the structure of pyrethrins, it was expected that fragments, cone voltage and collision energy were common to series I and II of the same species, and in some cases even between different species (i.e. cin I and II

PYRETHRIN

R=CH₃, pyr I

INF049 1 (0.509) Daughters of 329ES+ 2.04e6

20eV

INF040 1 (0.509) Daughters of 329ES+ 1.00e7

10eV

CINERIN

R=CH₃, cin I

INF053 1 (0.509) Daughters of 317ES+ 1.15e6

20eV

INF051 1 (0.509) Daughters of 317ES+ 1.59e6

10eV

JASMOLIN

R=CH₃, jas I

INF059 1 (0.509) Daughters of 331ES+ 3.86e5

20eV

INF057 1 (0.509) Daughters of 331ES+ 1.22e6

10eV

R=COOCH₃, pyr II

INF046 1 (0.509) Daughters of 373ES+ 1.78e6

20eV

INF044 1 (0.509) Daughters of 373ES+ 6.99e6

10eV

R=COOCH₃, cin II

INF064 1 (0.509) Daughters of 361ES+ 8.67e5

20eV

INF062 1 (0.509) Daughters of 361ES+ 1.25e6

10eV

R=COOCH₃, jas II

INF069 1 (0.509) Daughters of 375ES+ 2.66e5

20eV

INF067 1 (0.509) Daughters of 375ES+ 8.74e5

10eV

Selected conditions for the LC–MS/MS determination corresponded to 0.1 mM NH_4OAc into the aqueous mobile phase, which led to a satisfactory compromise between sensitivity and reproducibility. The most abundant product ion was used for

quantitative purposes (Q transition) and the other product ion for confirmative purposes (q transition).

In APCI experiments, full scan spectra were obtained from the infusion of 2 µg/mL (sum of pyrethrins) standard solution (50:50 methanol:water) using the Alliance 2695 at a flow rate of 1 mL/min. The full scan mass spectrum presented six peaks at m/z 329, 373 (Pyr I, Pyr II), 317, 361 (Cin I, Cin II), 331 and 375 (Jas I, Jas II) corresponding to $[M+H]^+$. In this case, $[M+Na]^+$ adducts were not observed as expected. MS/MS experiments showed the same fragmentation pattern as in the case of ESI, since the same precursor ions were selected.

The experimental MS/MS conditions selected for ESI and APCI are summarized in Table 1. The only difference between ESI and APCI conditions was the cone voltage, which was selected at 25 V (ESI) and 20 V (APCI).

3.2. Sample treatment optimization

Optimization of the sample treatment was carried out using lettuce (high water content matrix) samples; then, the optimized procedure was tested in the rest of the matrices. As a starting point three extraction solvents were tested: methanol, acetonitrile, and acetone/water (70:30). For this purpose, extractions of fortified samples were made in triplicate at 0.05 mg/kg level. Samples were allowed to stand for 1 h before extraction, and then 40 mL of extraction solvent were added. After extraction with Ultra-Turrax for 2 min, the volume was adjusted at 50 mL. Finally, the extracts were centrifuged and 20 µL directly injected in the LC system. In every experiments, matrix matched standards were prepared from a blank sample extracted with the solvent under study.

Results for methanol were no satisfactory for the individual quantification of pyrethrins, since the recoveries were slightly lower than 70%. In the case of acetonitrile and acetone/water (70:30), satisfactory recoveries (between 70 and 90%) were achieved for all pyrethrin components. Acetone/water (70:30) was finally selected because of the lower toxicity and cost of acetone. Previously to LC–MS/MS injection, the possibility of removing solid particles was tested by passing an aliquot of the raw extract through a 0.45 µm Nylon syringe filter (Scharlab, Barcelona, Spain). Losses of analytes and bad precision (repeatability) were observed; so direct injection of centrifuged extract was selected before LC–MS/MS analysis.

Once optimized the extraction of pyrethrins in lettuce, the procedure was applied to other high water content matrix as tomato, cucumber and pepper, a high acid content matrix as strawberry, and a high starch content matrix as potato. Good results were obtained in pepper, strawberry and potato. For tomato and cucumber low recoveries were observed for some pyrethrin components, so a modification in the extraction solvent was made, using 100% acetone. With this change, satisfactory recoveries were obtained for all pyrethrin components in tomato and cucumber. Acetone extraction was satisfactory for lettuce as well, but for pepper, strawberry and potato samples the extraction with acetone/water (70:30) mixture gave better recoveries.

Taking into account that pyrethrins can be used in a variety of crops, we also included in the study dry and fat matrices, rice and pistachio, respectively. Moreover, rice is also considered as in high starch content matrix, so it represents another example of this group together with potato. Rice samples were hydrated previous to acetone extraction. Thus, 5 mL of water were added to 5 g of rice and after 5 min 40 mL of acetone were added. Pistachio was extracted directly after adding 40 mL of acetone. In

both cases, extraction was carried out following the procedure described above. Good results were obtained in rice, but a large signal decrease along analysis sequence was observed for some pyrethrins in pistachio samples, probably due to ESI source ionization contamination. Trying to improve these results, two approaches were considered, adding a clean-up step or using an alternative ionization source, such as APCI. As the development of a successful clean-up step is often laborious and as APCI is indicated for the analysis of fatty samples, because it is less affected by the matrix, we decided to first evaluate the analytes behavior in the APCI source. So, pistachio extracts were additionally injected using APCI interface. However, lower sensitivity was observed compared to ESI interface, preventing validation at the lowest level assayed (0.05 mg/kg). Nevertheless, good results were obtained for all pyrethrin components at the highest validation level (0.5 mg/kg). **Fig. 3** shows a comparison between a matrix-matched standard for pistachio at 50 ng/mL in both ESI and APCI. It can be seen that responses in ESI were from 10 to 24-times higher than in APCI depending on the analyte.

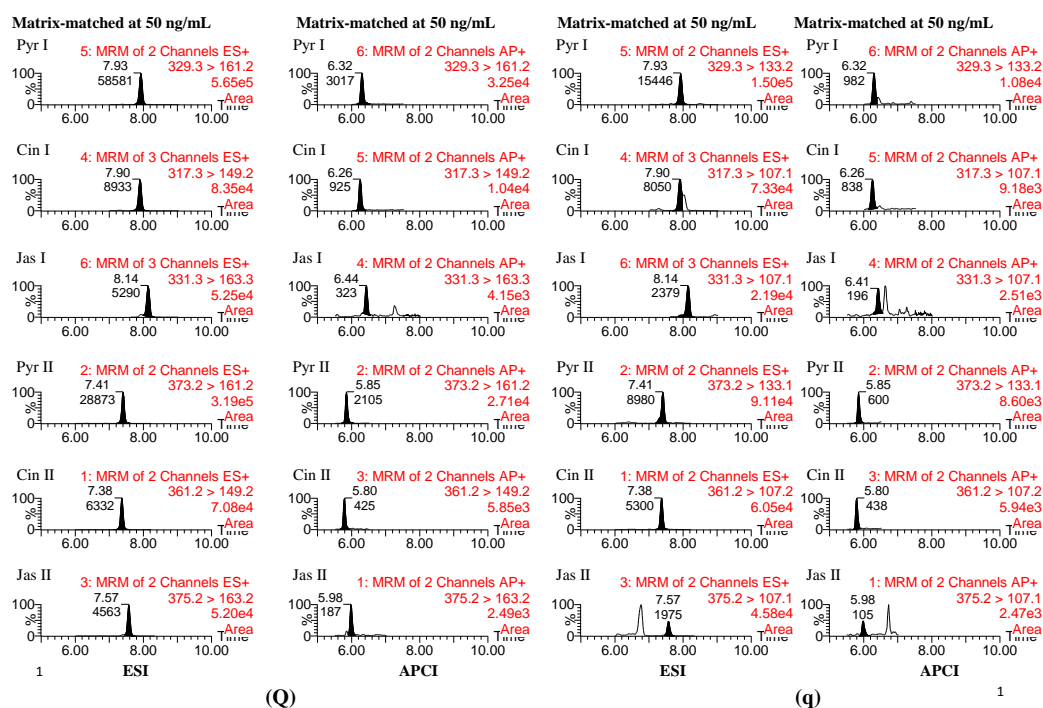


Fig. 3. LC-MS/MS chromatograms for pistachio matrix-matched standard at 50 ng/mL using ESI and APCI interfaces. (Left) Quantification transition (Q); (right) confirmation transition (q)

3.3. Method validation

Method validation was carried out using ESI interface, except in the case of pistachio samples in which APCI interface was also used. Moreover, experiments were carried out performing all calculations for each individual pyrethrin component with both quantification (Q) and confirmation (q) transitions.

Linearity was satisfactory for all matrices in the range tested: 2.5–100 ng/mL for rice and pistachio (equivalent to 0.025–1 mg/kg in sample); 5–250 ng/mL (equivalent to 0.025–1.25 mg/kg) for the rest of matrices. Calibration curves fitted to a first-order equation for all compounds and matrices. Correlation coefficients higher than 0.995 and residuals lower than 20% were obtained in both acetone and acetone/water (70:30) extract. For pistachio extracts, correlation coefficients were higher than 0.993 for all pyrethrin components, but residuals were around 50% for pyr I, cin I, and jas I, and below 30% for pyr II, cin II and jas II (ESI).

Precision (repeatability) and accuracy (recovery) were estimated by analyzing, in quintuplicate, blank samples spiked at two levels: 0.054 and 0.54 mg/kg, referred to all pyrethrins (hereafter referred as 0.05 and 0.5 mg/kg). Individual pyrethrin concentrations were: pyr I 0.024 and 0.24 mg/kg; pyr II 0.018 and 0.18 mg/kg; cin I 0.002 and 0.02 mg/kg; cin II 0.004 and 0.04 mg/kg; jas I 0.004 and 0.04 mg/kg; jas II 0.002 and 0.02 mg/kg, respectively.

The method based on acetone/water (70:30) extraction led to satisfactory recoveries between 70 and 110% and good precision (below 14%) for all pyrethrin components in lettuce, pepper, strawberry and potato considering both transitions (Q, q). A few exceptions occurred in tomato with low recoveries and high RSD for pyr II and

cin II, and in cucumber, with recoveries around 50% for pyr I and pyr II. **Table 2** shows validation results for the matrices under study (see supplementary data for results obtained using the confirmation transition (q); **Table S1**).

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2013.07.090>.

Table 2. Results of quantitative validation for pyrethrins in six sample matrices. Extraction with acetone:water (70:30). Data obtained using the quantitative transition (Q) and electrospray interface.

Compound	Lettuce		Pepper		Tomato		Cucumber		Strawberry		Potato	
	0.05 mg/kg	0.5 mg/kg	0.05 mg/kg	0.5 mg/kg	0.05 mg/kg	0.5 mg/kg	0.05 mg/kg	0.5 mg/kg	0.05 mg/kg	0.5 mg/kg	0.05 mg/kg	0.5 mg/kg
Pyrethrin I	81 (4)	83 (2)	97 (4)	103 (6)	87 (4)	83 (7)	<u>56 (5)</u>	<u>43 (6)</u>	85 (4)	92 (4)	71 (3)	85 (12)
Pyrethrin II	79 (5)	73 (4)	91 (8)	90 (6)	85 (4)	<u>53 (13)</u>	<u>53 (4)</u>	<u>49 (2)</u>	82 (3)	87 (4)	70 (3)	72 (4)
Cinerin I	80 (6)	86 (2)	101 (8)	102 (6)	74 (10)	83 (6)	72 (5)	74 (5)	98 (9)	107 (6)	80 (6)	104 (14)
Cinerin II	76 (9)	72 (6)	97 (6)	85 (9)	73 (9)	<u>64 (24)</u>	98 (4)	78 (2)	94 (6)	95 (3)	70 (4)	76 (5)
Jasmolin I	84 (6)	86 (6)	90 (9)	93 (8)	76 (8)	81 (8)	76 (6)	74 (5)	105 (6)	110 (8)	97 (4)	102 (11)
Jasmolin II	72 (5)	73 (6)	80 (11)	70 (3)	76 (11)	80 (4)	83 (5)	75 (3)	90 (5)	92 (3)	70 (4)	77 (6)

Underlined: Data out of the general accepted values (recovery 70-110%; RSD<20%).

The method based on acetone extraction notably improved recoveries for cucumber and tomato and also gave good results for lettuce and rice (recoveries between 71 and 107% and RSD below 15% both Q and q transitions). However, poor recoveries were obtained for some pyrethrin components in pepper, strawberry and potato.

In relation to pistachio samples, only acetone extraction was tested. Different results were found for groups I and II. In the first group, poor recoveries were achieved at the two levels assayed probably, due to the large signal decrease observed along the sample sequence analysis. Moreover, the *q* transition was interfered by matrix components for cin I. Regarding the second group, pyr II, cin II and jas II, they showed satisfactory recoveries and RSD for both transitions as no signal decrease was observed during sample injection (see Table 3). In order to improve these results, pistachio extracts were also injected under APCI mode. As stated above, the lower sensitivity resulting from APCI interface respect to ESI made unfeasible the validation at 0.05 mg/kg level. There was no signal decrease in APCI along sample injections allowing to perform the validation at 0.5 mg/kg, a level that still fulfill the required MRL (1 mg/kg). Linearity using APCI was tested between 25 and 1000 ng/mL, equivalent to 0.25–10 mg/kg in sample, obtaining satisfactory results for all pyrethrin components, with correlation coefficients higher than 0.998 and residuals lower than 20%. Precision and accuracy were estimated by analyzing, in quintuplicate, samples spiked at 0.05 and 0.5 mg/kg (ESI) and 0.5 mg/kg (APCI) referred to all pyrethrins. Recoveries were more satisfactory under APCI mode, with values between 81 and 105% and RSD values below 12%. Although APCI was only tested for pistachio, from a routine point of view it might be interesting the use of APCI for analysis of all matrices, despite its lower sensitivity, as the MRLs are always above 1 mg/kg.

Table 3 shows validation results for all studied matrices studies when acetone extraction was applied. This table also shows data for pistachio for both ESI and APCI interfaces (see supplementary data for results obtained using the confirmation transition (*q*); Table S2).

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2013.07.090>.

Table 3. Results of quantitative validation for pyrethrins in eight sample matrices. Extraction with acetone. Data obtained using the quantitative transition (Q) and electrospray interface.

Compound	Lettuce		Pepper		Tomato		Cucumber		Strawberry		Potato		Rice		Pistachio		APCI 0.5 mg/kg
	0.05 mg/kg	0.5 mg/kg	0.05 mg/kg	0.5 mg/kg	0.05 mg/kg	0.5 mg/kg	0.05 mg/kg	0.5 mg/kg	0.05 mg/kg	0.5 mg/kg	0.05 mg/kg	0.5 mg/kg	0.05 mg/kg	0.5 mg/kg	0.05 mg/kg	0.5 mg/kg	
Pyrethrin I	75 (3)	87 (4)	87 (13)	86 (5)	94 (5)	96 (4)	81 (4)	86 (3)	<u>49 (3)</u>	<u>67 (3)</u>	<u>58 (6)</u>	<u>67 (6)</u>	91 (4)	82 (8)	<u>63 (15)</u>	<u>56 (9)</u>	84 (11)
Pyrethrin II	85 (2)	93 (1)	81 (10)	76 (7)	91 (6)	84 (6)	78 (3)	82 (3)	<u>68 (2)</u>	76 (1)	<u>62 (7)</u>	<u>63 (8)</u>	93 (8)	74 (4)	99 (3)	84 (4)	96 (7)
Cinerin I	78 (1)	89 (2)	90 (3)	89 (4)	88 (8)	101 (6)	77 (7)	91 (2)	87 (6)	92 (2)	<u>62 (4)</u>	76 (4)	90 (8)	84 (8)	<u>63 (26)</u>	<u>59 (10)</u>	104 (7)
Cinerin II	90 (4)	95 (3)	<u>68 (17)</u>	74 (8)	88 (7)	86 (4)	83 (2)	86 (3)	82 (2)	87 (2)	<u>66 (4)</u>	71 (11)	97 (8)	75 (5)	98 (3)	85 (5)	100 (4)
Jasmolin I	72 (2)	76 (4)	80 (7)	85 (6)	98 (3)	98 (5)	82 (8)	86 (2)	86 (6)	83 (2)	70 (12)	71 (9)	85 (8)	81 (4)	<u>53 (27)</u>	<u>55 (6)</u>	84 (11)
Jasmolin II	93 (3)	97 (5)	75 (5)	79 (9)	99 (4)	89 (6)	87 (5)	88 (3)	92 (5)	88 (1)	107 (3)	71 (6)	91 (8)	84 (5)	73 (15)	70 (3)	81 (12)

Underlined: Data out of the general accepted values (recovery 70-110%; RSD<20%).

Thus, in the light of obtained results, it is recommended acetone/water (70:30) extraction for pepper, strawberry and potato; and acetone extraction for cucumber, tomato, rice and pistachio. Either of the two extractions is suitable for lettuce.

The LOQ objective of 0.05 mg/kg was reached in nearly all the individual pyrethrin/matrix combinations tested (0.5 mg/kg for pistachio), as this was the lowest level validated with satisfactory results. This is a reliable value for routine analysis and illustrates the performance of the overall method for quantitative analysis, in the line of SANCO guidelines [24, 25, 27]. This LOQ objective corresponds to individual pyrethrins concentrations of: pyr I 0.024 mg/kg; pyr II 0.018 mg/kg; cin I 0.02 mg/kg; cin II 0.004

mg/kg; jas I 0.004 mg/kg; jas II 0.002 mg/kg. In order to illustrate the sensitivity of the method, statistical LOQs and LODs were also estimated from the chromatograms at the lowest level of the matrix-matched calibration curve, (quantification transition (Q)).

As it can be seen in **Table 4**, using ESI individual statistical LOQs were in the range 0.2 and 5.3 µg/kg. LODs were between 0.05 and 1.6 µg/kg, reaching extremely low levels for jas II in the case of potato and rice. For pistachio, statistical LOQs and LODs using APCI were considerably higher than with ESI.

Fig. 4a and **b** show LC–MS/MS chromatograms for quantification and confirmation transitions, respectively, for strawberry after extraction with acetone/water (70:30). Chromatograms were taken from validation experiments and correspond to a blank sample, a spiked sample at 0.05 mg/kg, and a matrix-matched standard of 10 ng/mL (corresponding to 0.05 mg/kg in sample).

Table 4. Individual statistical LOQ and LOD values (in $\mu\text{g/kg}$) for pyrethrins in the different matrices under study.

Compound	Lettuce		Pepper		Tomato		Cucumber		Strawberry		Potato		Rice		Pistachio		Pistachio APCI	
	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD
Pyrethrin I	2.00	0.60	2.00	0.60	1.00	0.30	1.00	0.30	0.70	0.20	0.70	0.20	1.00	0.30	1.00	0.30	17	52
Pyrethrin II	3.00	0.90	2.30	0.70	2.30	0.70	1.70	0.50	0.70	0.20	0.30	0.10	0.70	0.20	1.30	0.40	30	9
Cinerin I	0.30	0.10	0.70	0.20	0.30	0.10	0.30	0.10	0.30	0.10	0.30	0.10	0.30	0.10	0.30	0.10	17	5
Cinerin II	1.70	0.50	1.30	0.40	1.70	0.50	0.70	0.20	1.00	0.30	0.30	0.10	0.30	0.10	0.70	0.20	17	5
Jasmolin I	5.30	1.60	3.30	1.00	3.00	0.90	3.30	1.00	2.30	0.70	0.30	0.10	1.70	0.50	0.70	0.20	50	15
Jasmolin II	0.70	0.20	1.00	0.30	1.70	0.50	0.30	0.30	1.00	0.30	0.20	0.05	0.20	0.05	0.70	0.20	10	3

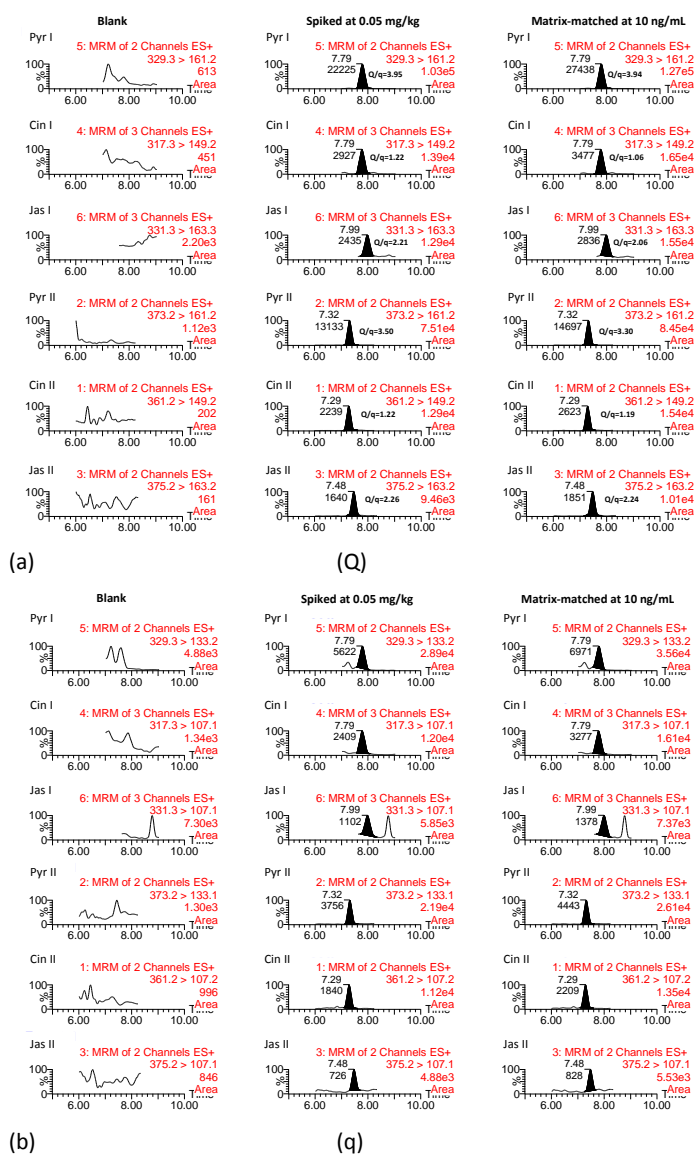


Fig. 4. Representative LC–MS/MS chromatograms for strawberry (blank sample, sample spiked at 0.05 mg/kg and): (a) quantification transition (Q); (b) confirmation transition (q)

3.4. Analysis of samples

The developed procedure was applied to 11 samples purchased in local markets (three strawberry, four tomato and four lettuce). For strawberry samples, acetone/water procedure was applied, while tomatoes and lettuces were extracted with acetone. Two Quality Control (QCs) at 0.05 and 0.5 mg/kg were included for each type of sample in the analysis sequence. No pyrethrin residues were found in any of these samples. Additionally, potatoes obtained from a local farmer, who applied pyrethrin as postharvest insecticide 2 weeks earlier, were also analyzed using acetone/water extraction, and including two QCs at the validated levels. In this case, pyrethrin residues were found at a total concentration of 0.15 mg/kg, i.e. 0.047 mg/kg for pyr I (31%), 0.029 mg/kg for pyr II (20%), 0.017 mg/kg for cin I (11%), 0.02 mg/kg for cin II (13%), 0.023 mg/kg for jas I (15%) and 0.014 mg/kg for jas II (9%). The acquisition of two transitions allowed the reliable identification of each pyrethrin component in this potato sample. Q/q ratios in the sample presented deviations lower than 20% when compared with those obtained from matrix-matched calibration standards.

Fig. 5 shows the LC-MS/MS chromatograms for the quantification and confirmation transitions corresponding to the positive potato sample (0.15 mg/kg). Q/q ratios and their deviations are also shown to support confirmation of identity of the individual pyrethrins in the sample.

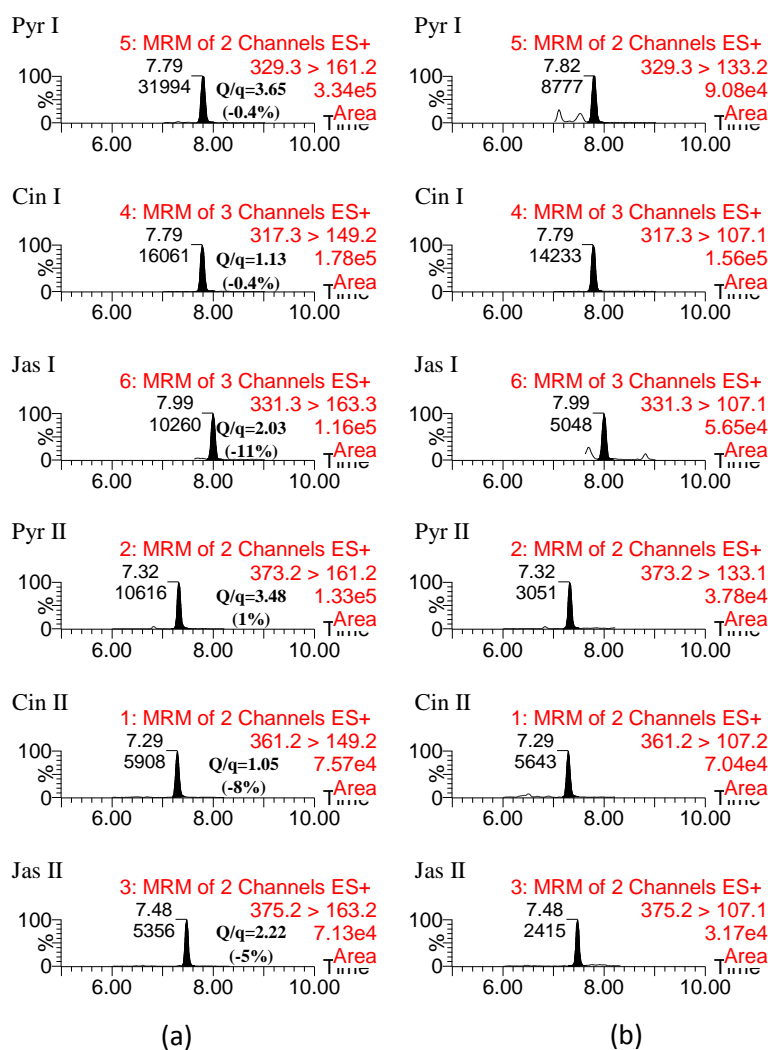


Fig. 5. LC-MS/MS chromatograms corresponding to a positive potato sample (0.15 mg/kg). Q/q ratios and deviations from those of matrix-matched standards are also shown in the chromatograms: (a) quantification transition (Q); (b) confirmation transition (q)

4. Conclusions

This paper shows a fast, reliable and sensitive method for individual pyrethrin determination by LC–MS/MS in eight fruit and vegetable matrices representative of the food matrix groups considered in European guidelines [24, 26]: high water content (lettuce, pepper, cucumber and tomato), high oil content (pistachio), high acid content (strawberry), high starch content (potato and rice) and dry matrices (rice). After extraction with acetone or acetone/water, 70:30, depending on the type of sample, the determination was carried out without any clean-up. Not only the accurate quantification, but also the reliable identification of each individual component was feasible thanks to the acquisition of two MS/MS transitions for each component. The high sensitivity reached makes this analytical methodology fully appropriate to monitoring the compliance of MRL in vegetable and fruit matrices.

A comparison of the ESI and APCI interfaces showed that APCI was less affected by the matrix components, being more suitable for analysis of fat matrices, such as pistachio, despite the lower sensitivity achieved.

The optimized method was applied to analysis of several samples, allowing to find the six individual pyrethrins in a potato sample, which all were quantified and successfully identified.

Acknowledgment

The authors acknowledge the support of Generalitat Valenciana, as research group of excellence (Prometeo 2009/054).

References

- [1] C.D.S. Tomlin (Ed.), The Pesticide Manual, British Crop Protection Council, Farnham, UK, 1997, p. 1056.
- [2] A. Angioni, F. Dedola, E.V. Minelli, A. Barra, P. Cabras, P. Caboni, J. Agric. Food Chem. 53 (2005) 4059.
- [3] Commission Regulation (EC) No. 889/2008 of 5 September 2008 laying down detailed rules for the implementation of Council Regulation (EC) No. 834/2007 on organic production and labelling of organic products with regard to organic production, labelling and control. Off. J. Eur. Commun. L250/1, 18.9.2008.
- [4] P. Caboni, E.V. Minello, M. Cabras, A. Angioni, G. Sarais, F. Dedola, P. Cabras, J. Agric. Food Chem. 55 (2007) 832.
- [5] Regulation (EC) No. 396/2005 of the European parliament and of the council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC. Off. J. Eur. Commun. L70/1, 16.03.2005. Consolidated version obtained from <http://ec.europa.eu/sanco/pesticides/public/index.cfm>
- [6] T.G. Danis, D.T. Karagiozoglou, I.N. Tsakiris, A.K. Alegakis, A.M. Tsatsakis, Food Chem. 126 (2011) 97.
- [7] Y. Pico, G. Font, M.J. Ruiz, M. Fernandez, Mass Spectrom. Rev. 25 (2006) 917.
- [8] D.F.K. Rawn, J. Judge, V. Roscoe, Anal. Bioanal. Chem. 397 (2010) 2525.
- [9] C. Bicchi, C. Brunelli, M. Galli, A. Sironi, J. Chromatogr. A 931 (2001) 129.

- [10] K.T. Nguyen, R. Moorman, V. Kuykendall, J. AOAC Int. 81 (1998) 503.
- [11] C. Lu, X. Liu, F. Dong, J. Xu, W. Song, C. Zhang, Y. Li, Y. Zheng, Anal. Chim. Acta 678 (2010) 56.
- [12] P. Caboni, G. Sarais, A. Angioni, V.L. Garau, P. Cabras, J. Agric. Food Chem. 53 (2005) 8644.
- [13] B.L. Loper, K.A. Anderson, J. AOAC Int. 86 (2003) 1236.
- [14] X. Zang, E.K. Fukuda, J.D. Rosen, J. Agric. Food Chem. 46 (1998) 2206.
- [15] G.F. Antonious, M.E. Byers, W.C. Kerst, J. Environ. Sci. Health B 32 (1997) 621.
- [16] M.I. Cervera, C. Medina, T. Portoles, E. Pitarch, J. Beltran, E. Serrahima, L. Pineda, G. Munoz, F. Centrich, F. Hernandez, Anal. Bioanal. Chem. 397 (2010) 2873.
- [17] S. Haque, A.H.A. Farooqi, M.M. Gupta, R.S. Sangwan, A. Khan, Plant Growth Regul. 51 (2007) 263.
- [18] G.F. Antonious, J. Environ. Sci. Health B 39 (2004) 491.
- [19] O.J. Pozo, J.V. Sancho, M. Ibanez, F. Hernandez, W.M.A. Niessen, TRAC-Trends Anal. Chem. 25 (2006) 1030.
- [20] I. Ruiz, A. Morales, J. Oliva, A. Barba, J. Environ. Sci. Health B 46 (2011) 530.
- [21] S.W.C. Chung, C.H. Lam, Anal. Bioanal. Chem. 403 (2012) 885.
- [22] R. Romero Gonzalez, A. Garrido Frenich, J.L. Martinez-Vidal, O.D. Prestes, S.L. Grió, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 1477.

[23] O.D. Prestes, J. Antonio Padilla-Sanchez, R. Romero-Gonzalez, S. Lopez Grio, A. Garrido Frenich, J. Luis Martinez-Vidal, J. Sep. Sci. 35 (2012) 861.

[24] European Commission Directorate General Health and Consumer Protection, Guidance document on pesticide residue analytical methods, Sanco/825/00 rev.8.1, 16.11.2010.

[25] European Commission Directorate General Health and Consumer Protection, Guidance for generating and reporting methods of analysis in support of pre-registration data requirements for Annex II (part A, Section 4) and Annex III (part A, Section 5) of Directive 91/414, Sanco/3029/99 rev.4, 11.07.2000.

[26] Organisation for Economic Co-operation and Development, Environment Directorate Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, Pesticides and Biotechnology, Series on testing and assessment No. 72, Series on Pesticides No. 39. Guidance Document on Pesticide Residue Analytical Methods, ENV/JM/MONO (2007) 17, 13.08.2007.

[27] European Commission Directorate General Health and Consumer Protection, Guidance Document on Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed, Sanco/12495/2011, 01.01.2012.

Supplementary data

Table S1. Results of quantitative validation for pyrethrins in six sample matrices. Extraction with acetone:water (70:30). Data obtained using the confirmation transition (q) and electrospray interface.

Compound	Lettuce		Pepper		Tomato		Cucumber		Strawberry		Potato	
	0.05 mg/kg	0.5 mg/kg	0.05 mg/kg	0.5 mg/kg	0.05 mg/kg	0.5 mg/kg	0.05 mg/kg	0.5 mg/kg	0.05 mg/kg	0.5 mg/kg	0.05 mg/kg	0.5 mg/kg
Pyrethrin I	80 (2)	82 (3)	101 (4)	103 (6)	87 (9)	84 (8)	<u>55 (6)</u>	<u>41 (7)</u>	84 (6)	94 (5)	70 (4)	83 (11)
Pyrethrin II	72 (7)	73 (4)	93 (8)	93 (6)	81 (2)	<u>52 (13)</u>	<u>59 (4)</u>	<u>49 (3)</u>	79 (7)	90 (3)	71 (5)	70 (7)
Cinerin I	96 (10)	89 (3)	110 (14)	105 (4)	107 (12)	86 (4)	89 (8)	75 (6)	100 (7)	110 (9)	80 (11)	104 (12)
Cinerin II	76 (7)	73 (4)	94 (5)	87 (6)	80 (4)	<u>61 (31)</u>	<u>146 (8)</u>	82 (3)	87 (5)	97 (3)	71 (4)	78 (5)
Jasmolin I	81 (10)	89 (4)	87 (12)	98 (10)	76 (18)	82 (5)	85 (26)	77 (9)	96 (8)	110 (10)	106 (10)	90 (14)
Jasmolin II	71 (3)	72 (5)	83 (13)	72 (5)	78 (11)	77 (5)	91 (14)	76 (7)	84 (6)	94 (3)	70 (16)	76 (12)

Underlined: Data out of the general accepted values (recovery 70-110%; RSD<20%).

Table S2. Results of quantitative validation for pyrethrins in eight sample matrices. Extraction with acetone. Data obtained using the confirmation transition (q) and electrospray interface.

Compound	Lettuce		Pepper		Tomato		Cucumber		Strawberry		Potato		Rice		Pistachio		APCI 0.5 mg/kg
	0.05 mg/kg	0.5 mg/kg	0.05 mg/kg	0.5 mg/kg	0.05 mg/kg	0.5 mg/kg	0.05 mg/kg	0.5 mg/kg	0.05 mg/kg	0.5 mg/kg	0.05 mg/kg	0.5 mg/kg	0.05 mg/kg	0.5 mg/kg	0.05 mg/kg	0.5 mg/kg	
Pyrethrin I	74 (5)	86 (3)	86 (11)	86 (4)	92 (5)	97 (4)	83 (5)	86 (3)	<u>47 (2)</u>	<u>68 (3)</u>	<u>59 (4)</u>	<u>67 (5)</u>	93 (3)	83 (7)	<u>58 (17)</u>	<u>56 (8)</u>	103 (7)
Pyrethrin II	87 (5)	91 (2)	81 (13)	77 (9)	85 (7)	85 (6)	80 (3)	82 (2)	70 (6)	76 (1)	<u>61 (5)</u>	<u>63 (7)</u>	107 (5)	74 (4)	108 (5)	83 (5)	99 (5)
Cinerin I	71 (5)	87 (2)	88 (10)	89 (5)	87 (15)	104 (7)	104 (13)	87 (5)	88 (7)	92 (3)	<u>64 (2)</u>	76 (5)	95 (5)	83 (7)	-	<u>62 (10)</u>	102 (11)
Cinerin II	90 (0.3)	94 (3)	<u>109 (43)</u>	74 (9)	94 (8)	86 (5)	84 (4)	85 (3)	83 (1)	86 (0.4)	<u>65 (6)</u>	71 (10)	105 (5)	76 (4)	97 (5)	84 (4)	105 (7)
Jasmolin I	73 (3)	74 (5)	82 (13)	85 (6)	104 (7)	100 (5)	80 (7)	85 (3)	90 (10)	85 (2)	<u>67 (9)</u>	70 (8)	88 (12)	83 (5)	<u>57 (9)</u>	<u>42 (10)</u>	81 (10)
Jasmolin II	94 (7)	101 (6)	74 (4)	79 (5)	96 (8)	91 (7)	79 (6)	87 (4)	77 (7)	89 (2)	<u>65 (9)</u>	70 (7)	101 (10)	86 (4)	78 (17)	70 (6)	86 (12)

Underlined: Data out of the general accepted values (recovery 70-110%; RSD<20%).

4.2.3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Optimización de las condiciones MS/MS

Los espectros full-scan en modo ESI positivo mostraron que los iones mayoritarios correspondían a los aductos $[M+Na]^+$, por lo que estudió la posibilidad de añadir HCOOH y NH_4Ac como modificadores a fin de minimizar la presencia de estos aductos y favorecer la formación de los iones $[M+H]^+$. En el caso del HCOOH no se consiguió aumentar la proporción de $[M+H]^+$; en cambio, cuando se adicionó NH_4Ac , los aductos sodiados prácticamente desaparecieron y se vio muy favorecida la formación de $[M+H]^+$. La *Figura 1 del artículo científico 5* muestra los espectros full-scan obtenidos.

Se seleccionó $[M+H]^+$ como ión precursor y se obtuvieron los espectros MS/MS para cada compuesto. Debido a la similitud entre las estructuras de las piretrinas, las series I y II presentaron fragmentos comunes para cada grupo. Así mismo, los voltajes de cono y las energías de colisión optimizadas fueron muy parecidos para todas las piretrinas.

Se realizó también una optimización de las condiciones MS/MS con interfase APCI, obteniendo resultados semejantes a ESI, ya que se partió de los mismos iones precursores $[M+H]^+$.

La *Tabla 1 del artículo científico 5* muestra las condiciones MS/MS seleccionadas para ESI y APCI.

Optimización del tratamiento de muestra

Uno de los principales objetivos en el desarrollo de metodología analítica fue efectuar un tratamiento de muestra lo más sencillo posible, con el fin de minimizar los errores asociados a esta etapa. Además, se pretendía que fuera de aplicación a los diferentes grupos de matrices vegetales descritos en las guías europeas (OECD, 2007; European Commission, 2010). Para ello, se diseñó un método sencillo, con un tratamiento de muestra consistente en trituración y homogenización, seguida de una extracción con ultratúrrax, y posterior inyección directa de 20 µL del extracto crudo en el sistema LC-MS/MS.

El principal factor considerado fue el disolvente de extracción. Inicialmente, se seleccionaron MeOH, ACN y una mezcla acetona/H₂O (70:30), utilizando en esta primera fase del estudio la lechuga (grupo de alto contenido en agua) como matriz representativa. Los resultados fueron satisfactorios con ACN y con la mezcla acetona/H₂O (70:30), seleccionando esta última por su menor precio y toxicidad. Se descartó el MeOH ya que proporcionó recuperaciones bajas para algunos de los analitos. La Tabla 4.1 muestra los resultados obtenidos, en cuanto a recuperación, para los disolventes estudiados.

Tabla.4.1. Recuperaciones (%) obtenidas en el estudio realizado con distintos disolventes de extracción.

	Metanol	Acetonitrilo	Acetona/H ₂ O (70:30, v:v)
Piretrin I	72	79	81
Cinerin I	63	78	81
Jasmolin I	77	74	75
Piretrin II	61	79	87
Cinerin II	65	75	90
Jasmolin II	68	77	76

Adicionalmente, se evaluó la posibilidad de filtrar los extractos crudos previamente a la inyección para preservar la columna, utilizando filtros de jeringa de nylon y celulosa. En ambos casos, se comprobó que se producían pérdidas entre el 45-70% de los analitos por retenciones en el filtro; además, se observó falta de reproducibilidad en estas pérdidas cuando se utilizó un calibrado en matriz (6 niveles), el cual se inyectó sin filtrar y filtrado utilizando los filtros de jeringa antes mencionados. Además de las bajadas en la señal, consecuencia de la retención en el filtro, se obtuvo una deficiente linealidad de los calibrados filtrados, consecuencia de la mala precisión, frente a los valores satisfactorios del coeficiente de regresión (mayor a 0.99) en el caso del calibrado no filtrado. La Figura 4.6 muestra a modo de ejemplo los cromatogramas obtenidos para un patrón en matriz de lechuga, a una concentración de 50 ng/mL, sin filtrar, utilizando un filtro de nylon y un filtro de celulosa.

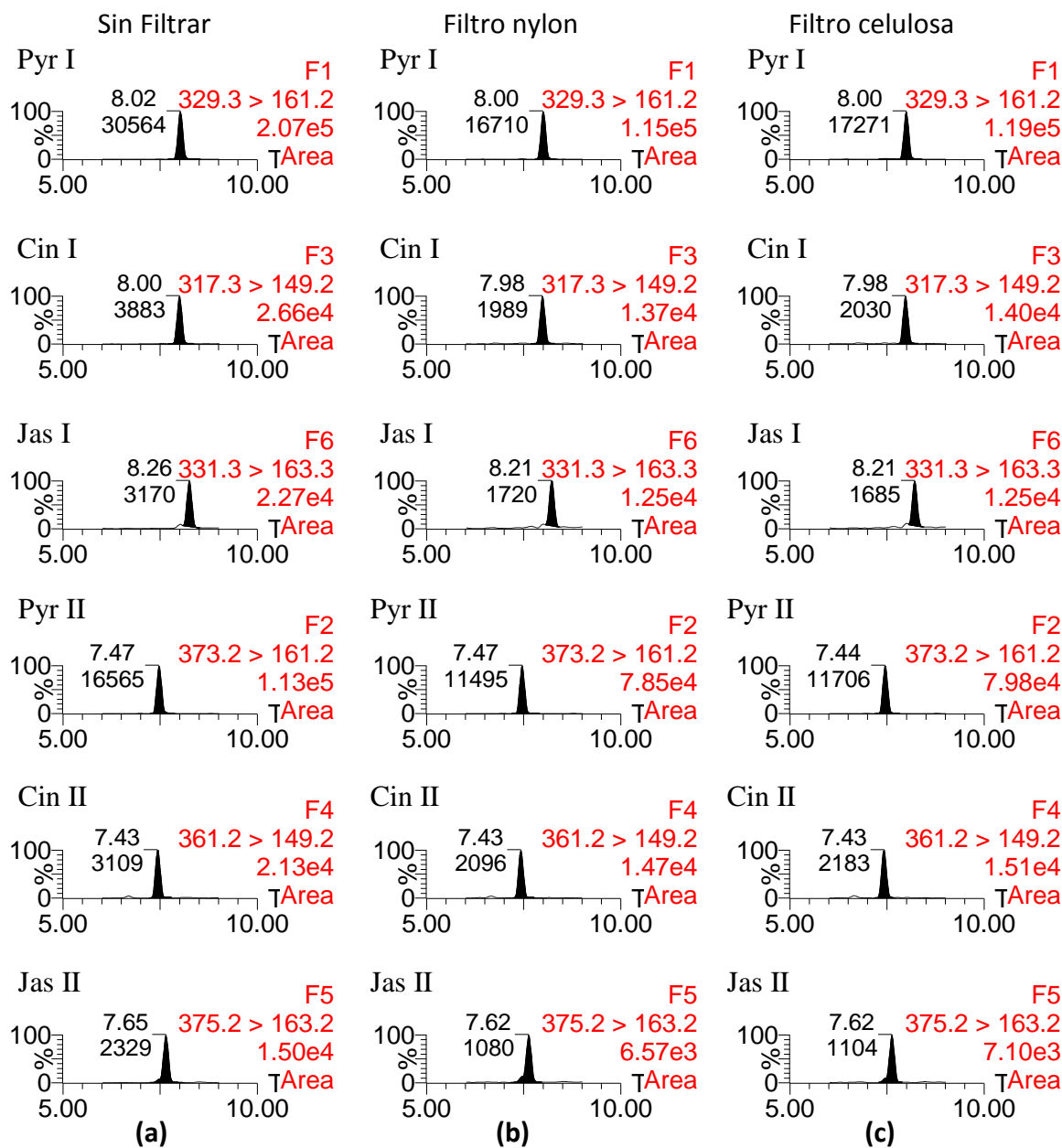


Figura 4.6. LC-MS/MS cromatogramas de un patrón en matriz de lechuga (50 ng/mL):
a) sin filtrar; b) Filtro nylon; c) filtro celulosa

A la vista de los resultados obtenidos, el procedimiento propuesto consistió en pesar una alícuota representativa del vegetal triturado, realizando la extracción con el disolvente seleccionado, acetona/H₂O (70:30, v:v) usando trituración con ultraturrax. Finalmente, se inyectó directamente una alícuota del extracto centrifugado en el sistema cromatográfico.

A continuación, se estudió la aplicabilidad del método a diversas matrices vegetales pertenecientes a otros grupos (alto contenido en agua, en ácido y en almidón). En el caso de las matrices seleccionadas con alto contenido en agua (pimiento, tomate y pepino), los resultados fueron dispares, ya que en pimiento se obtuvieron recuperaciones satisfactorias para todos los analitos, pero sin embargo algunos de estos valores no resultaron adecuados en el caso de tomate y pepino. Para matrices con alto contenido en ácido y en almidón (fresa y patata, respectivamente), los resultados fueron satisfactorios.

Con la finalidad de mejorar el método en tomate y pepino, se aumentó el porcentaje de acetona en el disolvente de extracción hasta el 100% consiguiendo, en este caso, buenas recuperaciones para todas las piretrinas. A continuación, con el objetivo de intentar aplicar un procedimiento común para todas las matrices estudiadas, se probó la eficacia de la extracción en estas condiciones para el resto de muestras. Los resultados, en términos de recuperación, fueron aceptables para lechuga y pimiento, pero no, para fresa y patata.

Por último, se aplicó la extracción con acetona (100%) a matrices secas y con alto contenido en grasa, tales como arroz y pistacho. En el caso de matrices con alto contenido en grasa, no se consideró la extracción con acetona/H₂O (70:30) por incompatibilidad con la propia matriz. Para matrices secas, como cereales o frutas secas,

es recomendable añadir agua y que ésta entre en contacto con la matriz previamente a la extracción, ya que la mayoría de vegetales conllevan intrínseco un elevado porcentaje de agua. Los resultados obtenidos en el caso de arroz fueron adecuados; en cambio, para el pistacho se observó una acusada disminución de la señal para los analitos del grupo I (pyr I, cin I y jas I) a lo largo de la secuencia de inyección, probablemente debido a la contaminación de la fuente de ionización, obteniendo recuperaciones por debajo del 65%. Se consideró que estos valores eran consecuencia de una incorrecta cuantificación como consecuencia de la falta de estabilidad de la respuesta cromatográfica.

Para reducir el efecto de la matriz y resolver el problema de cuantificación, se evaluaron dos posibles alternativas: la primera consistió en aplicar una etapa de purificación mediante extracción en fase sólida, y la segunda fue la inyección de los extractos en la interfase APCI, que por lo general se ve menos afectada por la matriz en comparación con ESI. Dado que resulta más sencilla la segunda alternativa, se decidió finalmente inyectar los extractos usando la interfase APCI, con lo cual se consiguió estabilizar la señal durante toda la secuencia de análisis y con ello, una mejor cuantificación de todos los analitos. Con esta interfase, las recuperaciones obtenidas fueron superiores al 80% para todos los compuestos. Sin embargo, se observó una menor sensibilidad en comparación con ESI, lo que impidió realizar la validación al nivel de 0.05 mg/kg. Dado que en la legislación europea (European Parliament, 2005) el LMR para piretrinas en pistacho es 1 mg/kg, se consideró adecuado llevar a cabo la validación al nivel más bajo de 0.5 mg/kg, pudiendo así mantener la simplicidad del método sin necesidad de recurrir a etapas de purificación adicionales. En la *Figura 3 del artículo científico 5* se muestran, a modo de ejemplo los cromatogramas correspondientes a un patrón en matriz de pistacho (50 ng/mL) inyectado en ESI y APCI.

Validación y análisis de muestras

La validación del método se llevó a cabo siguiendo las guías europeas (OECD, 2007; European Commission, 2000, European Commission, 2010). Se hizo especial hincapié en evaluar todas las características analíticas de forma individual para cada piretrina, considerando tanto las transiciones de cuantificación como las de confirmación. La interfase utilizada para todas las matrices estudiadas fue ESI, excepto para pistacho para el cual, como se ha mencionado en el apartado anterior, se realizó de modo adicional la inyección de los extractos en APCI.

Con objeto de obtener la máxima información sobre los procedimientos de extracción propuestos, las muestras de lechuga, pepino, tomate, pimiento, fresa y patata, fueron sometidas a validación utilizando como disolventes de extracción tanto la mezcla acetona/H₂O (70:30, v:v) como acetona (100%). Los resultados permitieron recomendar el disolvente de extracción más adecuado para cada muestra.

Los niveles de fortificación en los ensayos de recuperación, para evaluar la precisión y exactitud, fueron 0.05 y 0.5 mg/kg, correspondientes a la suma de todas las piretrinas, siendo las concentraciones individuales: pyr I 0.024 y 0.24 mg/kg; pyr II 0.018 y 0.18 mg/kg; cin I 0.002 y 0.02 mg/kg; cin II 0.004 y 0.04 mg/kg; jas I 0.004 y 0.04 mg/kg; jas II 0.002 y 0.02 mg/kg, respectivamente. Las *Tablas 2 y 3 del artículo científico 5* muestran los resultados obtenidos en términos de recuperación y RSD (%) usando las transiciones de cuantificación. Las *Tablas S1 y S2* muestran estos resultados pero usando las transiciones de confirmación. A la vista de los resultados obtenidos, se recomienda llevar a cabo la extracción con acetona/H₂O (70:30, v:v) en pimiento, fresa y patata, y con acetona (100%) en pepino, tomate, arroz y pistacho. En el caso de las muestras de lechuga, ambas extracciones condujeron a resultados satisfactorios. En relación a las

muestras de pistacho, se recomienda llevar a cabo la inyección en APCI, cuyo uso también podría extenderse al resto de matrices en análisis rutinarios, pero con la consiguiente pérdida de sensibilidad.

El LOQ objetivo se estableció como el nivel más bajo validado con resultados satisfactorios (es decir, 0.05 mg/kg), pero con el fin de demostrar la sensibilidad del método también se realizó el cálculo estadístico de los LOQs y LODs, sobre la base de la relación señal/ruido del cromatograma (*Tabla 4 del artículo científico 5*). Respecto a los LOQs estadísticos alcanzados utilizando la interfase ESI, se obtuvieron valores en el rango entre 0.2 y 5.3 µg/kg, indicativos de la elevada sensibilidad del método desarrollado. Si se tienen en cuenta publicaciones recientes de métodos individuales de análisis de piretrinas, puede destacarse la mejora en términos de sensibilidad respecto al trabajo publicado por Romero et al. (Romero, 2011), en el cual, para muestras de pepino, se obtuvieron LOQs del orden de 10 µg/kg. Sin embargo, en el presente trabajo el peor de los casos en la muestra de pepino fue jas I, para el cual se obtuvo un valor tres veces menor. Por otro lado, Chung y Lam (Chung, 2012) obtuvieron valores de LOQ por debajo de 2 µg/kg, utilizando cromatografía líquida de ultra resolución (UHPLC), la cual proporciona picos muy estrechos, y en combinación con MS/MS favorece el desarrollo de métodos muy sensibles. En nuestro trabajo se obtuvieron LOQs del mismo orden sin necesidad de hacer uso de técnicas de mayor coste.

Finalmente, se demostró la aplicabilidad de la metodología desarrollada mediante el análisis de muestras reales. La introducción de 2 QCs a los niveles validados en cada secuencia de análisis, puso de manifiesto la robustez del método. Se estudió con detalle el proceso de identificación del compuesto detectado, en el caso de obtener una

muestra positiva, mediante el cálculo de la relación Q/q y su desviación respecto a un patrón en matriz (*Figura 5 del artículo científico 5*).

Como conclusión del trabajo realizado, cabe indicar que se ha desarrollado un método sencillo, rápido, robusto y sensible en 8 matrices vegetales representativas de los diferentes grupos considerados en las guías europeas. Los excelentes resultados obtenidos en cuanto a precisión y exactitud permiten llevar a cabo la cuantificación individual de cada piretrina utilizando tanto la transición de cuantificación como la de confirmación, con lo que el uso de la segunda transición queda fuertemente reforzado. Además, su elevada sensibilidad posibilita su aplicación para la vigilancia del cumplimiento de los LMRs establecidos en la exigente legislación europea

CAPITULO 5

BIBLIOGRAFÍA

Adou K, Bontoyan W R, Sweeney P J, **2001**

Multiresidue method for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables by accelerated solvent extraction and capillary gas chromatography

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49(9), 4153–4160

Agilent Technologies, **2007**

Agilent J&W GC Column Selection Guide, 1–148

Agüera A, Contreras M, Crespo J, Fernández A R, **2002**

Multiresidue method for the analysis of multiclass pesticides in agricultural products by gas chromatography-tandem mass spectrometry

The Analyst, 127(3), 347-354

Aguinaga N, Campillo N, Viñas P, Hernández M, **2009**

Solid-Phase Microextraction Coupled to Gas Chromatography-Mass Spectrometry for the Analysis of Famoxadone in Wines, Fruits, and Vegetables

Spectroscopy Letters, 42(6-7), 320–326

Ai J, **1997**

Headspace solid phase microextraction. Dynamics and quantitative analysis before reaching a partition equilibrium

Analytical Chemistry, 69(16), 3260–3266

Alder L, Greulich K, Kempe G, Vieth B, **2006**

Residue analysis of 500 high priority pesticides: Better by GC-MS or LC-MS/MS?

Mass Spectrometry Reviews, 25(6), 838–865

Anastassiades M, Lehotay S J, Stajnbaher D, **2003a**

Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe (QuEChERS) approach for the determination of pesticide residues

In *18th Annual Waste Testing and Quality Assurance Symposium, WTQA 2002 - Proceedings*, 231–241

Anastassiades M, Mastovska K, Lehotay S J, **2003b**

Evaluation of analyte protectants to improve gas chromatographic analysis of pesticides

Journal of Chromatography A, 1015(1-2), 163–184

Angioni A, Dedola F, Minelli E V, Barra A, Cabras P, Caboni P, **2005**

Residues and half-life times of pyrethrins on peaches after field treatments

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(10), 4059–4063

Ardrey R E, **2003**

Liquid chromatography-mass spectrometry: an introduction

John Wiley & Sons, Ltd

Arthur C L, Pawliszyn J, **1990**

Solid-phase microextraction with thermal desorption using fused-silica optical fibers

Analytical Chemistry, 62(19), 2145–2148

Atkinson B L, Blackman A J, Faber H, **2004**

The degradation of the natural pyrethrins in crop storage

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52(2), 280–287

Barcelo D, **1993**

Environmental analysis : techniques, applications, and quality assurance

Elsevier Science Publishers B.V.

Bartual J, Berenguer M J, **1985**

NTP: 143 Pesticidas: clasificación y riesgos principales

http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/NTP/Ficheros/101a200/ntp_143.pdf

Belardi R P, Pawliszyn J, **1989**

Application of chemically modified fused silica fibers in the extraction of organics from water matrix samples and their rapid transfer to capillary columns

Water Pollution Research Journal of Canada, 24(1), 179-191

Belmonte N, Retamal M, Martinez M A, Mezcua M, Fernandez A R, de Kok A, **2012a**

Determination of chlorothalonil in difficult-to-analyse vegetable matrices using various multiresidue methods

The Analyst, 137(10), 2513–2520

Belmonte N, Retamal M, Mezcua M, Fernández A R, **2012b**

A sensitive and selective method for the determination of selected pesticides in fruit by gas chromatography/mass spectrometry with negative chemical ionization

Journal of Chromatography A, 1264, 110–116

Beltran J, Lopez F J, Hernandez F, **2000**

Solid-phase microextraction in pesticide residue analysis

Journal of Chromatography A, 885(1-2), 389–404

Blakley C R, Vestal M L, **1983**

Thermospray interface for liquid chromatography/mass spectrometry

Analytical Chemistry, 55(4), 750–754

Blasco C, Font G, Pico Y, **2004**

Determination of dithiocarbamates and metabolites in plants by liquid chromatography-mass spectrometry

Journal of Chromatography A, 1028(2), 267–276

Bolaños P P, Moreno J L F, Shtereva D D, Frenich A G, Vidal J L M, **2007**

Development and validation of a multiresidue method for the analysis of 151 pesticide residues in strawberry by gas chromatography coupled to a triple quadrupole mass analyzer

Rapid Communications in Mass Spectrometry, 21(14), 2282–2294

Breetaudeau M, Lagarce L, Boels D, Harry P, **2011**

Metam sodium intoxication: the specific role of degradation products--methyl isothiocyanate and carbon disulphide-as a function of exposure

Clinical Toxicology, 49(5), 416–422

Caboni P, Minello E V, Cabras M, Angioni A, Sarais G, Dedola F, Cabras P, **2007**

Degradation of pyrethrin residues on stored durum wheat after postharvest treatment

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55(3), 832–835

Caboni P, Sarais G, Angioni A, Garau V L, Cabras P, **2005**

Fast and versatile multiresidue method for the analysis of botanical insecticides on fruits and vegetables by HPLC/DAD/MS

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(22), 8644–8649

Cain W S, Dourson M L, Kohrman M J, Allen B C, **2010**

Human chemosensory perception of methyl isothiocyanate: Chemesthesis and odor

Regulatory Toxicology and Pharmacology, 58(2), 173–180

Cajka T, Riddellova K, Zomer P, Mol H, Hajslova J, **2011**

Direct analysis of dithiocarbamate fungicides in fruit by ambient mass spectrometry

Food Additives and Contaminants Part A-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment, 28(10), 1372–1382

Caldas E D, Conceicao M H, Miranda M C C, de Souza L C K R, Lima J F, **2001**

Determination of dithiocarbamate fungicide residues in food by a spectrophotometric method using a vertical disulfide reaction system

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49(10), 4521–4525

Candole B L, Csinos A S, Wang D, **2007**

Concentrations in soil and efficacy of drip-applied 1,3-D plus chloropicrin and metam sodium in plastic-mulched sandy soil beds

Crop Protection, 26(12), 1801–1809

Cervera M I, Medina C, Portoles T, Pitarch E, Beltran J, Serrahima E, Pineda L, Muñoz G, Centrich F, Hernandez F, **2010**

Multi-residue determination of 130 multiclass pesticides in fruits and vegetables by gas chromatography coupled to triple quadrupole tandem mass spectrometry

Analytical and Bioanalytical Chemistry, 397(7), 2873–2891

Chai L K, Zaidel N D, Hansen H C B, **2012**

A rapid multi-residue method for the determination of pesticide residues in choy sum, yardlong beans and aubergines

Food Chemistry, 131(2), 611–616

Chen L, Chen W, Ma C, Du D, Chen X, **2011**

Electropolymerized multiwalled carbon nanotubes/polypyrrole fiber for solid-phase microextraction and its applications in the determination of pyrethroids

Talanta, 84(1), 104–108

Chen T, Chen G, **2007**

Identification and quantitation of pyrethroid pesticide residues in vegetables by solid-phase extraction and liquid chromatography/electrospray ionization ion trap mass spectrometry

Rapid Communications in Mass Spectrometry, 21(12), 1848–1854

Chen W, Poon K F, Lam M H W, **1998**

The Application of Solid Phase Microextraction in the Analysis of Organophosphorus Pesticides in a Food Plant

Environmental Science & Technology, 32(23), 3816–3820

Chen Y I, Su Y S, Jen J F, **2002**

Determination of dichlorvos by on-line microwave-assisted extraction coupled to headspace solid-phase microextraction and gas chromatography–electron-capture detection

Journal of Chromatography A, 976(1-2), 349–355

Chung S W C, Lam C H, **2012**

Development and validation of a method for determination of residues of 15 pyrethroids and two metabolites of dithiocarbamates in foods by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

Analytical and Bioanalytical Chemistry, 403(3), 885–896

Council Directive 90/642/EEC of 27 November 1990 on the fixing of maximum levels for pesticide residues in and on certain products of plant origin, including fruit and vegetables, **1990**

Official Journal of the European Communities, L350, 71–79

Crnogorac G, Schwack W, **2009**

Residue analysis of dithiocarbamate fungicides

Trac-Trends in Analytical Chemistry, 28(1), 40–50

De Jager L S, Perfetti G A, Diachenko G W, **2008**

Analysis of tetramethylene disulfotetramine in foods using solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry

Journal of Chromatography A, 1192(1), 36–40

Di Primo P, Gamliel A, Austerweil M, Steiner B, Beniches M, Peretz I, Katan J, **2003**

Accelerated degradation of metam-sodium and dazomet in soil: characterization and consequences for pathogen control

Crop Protection, 22(4), 635–646

Dourson M L, Kohrman M J, Allen B C, **2010**

Dose response assessment for effects of acute exposure to methyl isothiocyanate (MITC)

Regulatory Toxicology and Pharmacology, 58(2), 181–188

Dungan R S, Gan J Y, Yates S R, **2003**

Accelerated degradation of methyl isothiocyanate in soil

Water Air and Soil Pollution, 142(1-4), 299–310

Environmental Protection Agency (EPA), **1999**

Chlorothalonil

<http://www.epa.gov/pesticides/reregistration/REDs/factsheets/0097fact.pdf>

European Commission Health and Consumer Protection Directorate-General, **2000**

Residues: Guidance for generating and reporting methods of analysis in support of pre-registration data requirements for Annex II (part A, Section 4) and Annex III (part A, Section 5) of Directive 91/414. SANCO/3029/99 rev.4

European Commission Health and Consumer Protection Directorate-General, **2010**

Guidance document on pesticide residue analytical methods SANCO/825/00 rev.8.1.

European Commission Health and Consumer Protection Directorate-General, **2013**

Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. SANCO/12571/2013, 1–46.

European Commission Health and Consumer Protection Directorate-General, **2015a**

Approval of active substances

http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/approval_active_substances/index_en.htm

European Commission Health and Consumer Protection Directorate-General, **2015b**

Maximum Residue Levels

http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/max_residue_levels/index_en.htm

European Food Safety Authority (EFSA), **2012**

Reasoned opinion on the review of the existing maximum residue levels (MRLs) for chlorothalonil according to Article 12 of Regulation (EC) No 396/2005

EFSA Journal, 10(2940), 1–87

Fenn J B, Mann M, Meng C K, Wong S F, Whitehouse C M, **1989**

Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules

Science, 246(4926), 64-71

Feo M L, Eljarrat E, Barcelo D, **2010**

Determination of pyrethroid insecticides in environmental samples

Trac-Trends in Analytical Chemistry, 29(7), 692–705

Feo M L, Eljarrat E, Barceló D, **2011**

Performance of gas chromatography/tandem mass spectrometry in the analysis of pyrethroid insecticides in environmental and food samples

Rapid Communications in Mass Spectrometry, 25(7), 869–76

Fernandes V C, Domingues V F, Mateus N, Delerue C, **2012a**

Pesticide residues in Portuguese strawberries grown in 2009-2010 using integrated pest management and organic farming

Environmental Science and Pollution Research International, 19(9), 4184–4192

Fernandes V C, Vera J L, Domingues V F, Silva L M S, Mateus N, Delerue C, **2012b**

Mass spectrometry parameters optimization for the 46 multiclass pesticides determination in strawberries with gas chromatography ion-trap tandem mass spectrometry

Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 23(12), 2187–2197

Fernandez M, Llompart M, Lamas J P, Lores M, Garcia C, Cela R, Dagnac T, **2008**

Simultaneous determination of traces of pyrethroids, organochlorines and other main plant protection agents in agricultural soils by headspace solid-phase microextraction-gas chromatography

Journal of Chromatography A, 1188(2), 154–163

Filipe O M S, Santos S A O, Domingues M R M, Vidal M M, Silvestre A J D, Neto C P, Santos E B H, **2013**

Photodegradation of the fungicide thiram in aqueous solutions. Kinetic studies and identification of the photodegradation products by HPLC-MS/MS

Chemosphere, 91(7), 993–1001

Fussell R J, Hetmanski M T, Colyer A, Caldow M, Smith F, Findlay D, **2007a**

Assessment of the stability of pesticides during the cryogenic processing of fruits and vegetables

Food Additives and Contaminants, 24(11), 1247–1256

Fussell R J, Hetmanski M T, Macarthur R, Findlay D, Smith F, Ambrus A, Brodesser P J, **2007b**

Measurement uncertainty associated with sample processing of oranges and tomatoes for pesticide residue analysis

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55(4), 1062–1070

Fuster S, Beltran J, López F J, Hernández F, **2005**

Application of solid phase microextraction for the determination of soil fumigants in water and soil samples

Journal of Separation Science, 28(1), 98–103

Gamón M, Lleó C, Ten A, Mocholí F, **2001**

Multiresidue determination of pesticides in fruit and vegetables by gas chromatography/tandem mass spectrometry

Journal of AOAC International, 84(4), 1209–1216

Geis L, Lehotay S J, Heinzen H, **2012**

Effects of temperature and purity of magnesium sulfate during extraction of pesticide residues using the QuEChERS method

Journal of AOAC International, 95(5), 1311-1318

Gil M D, Barranco D, Martínez M, Parrilla P, **2006**

Simple, rapid solid-phase extraction procedure for the determination of ultra-trace levels of pyrethroids in ground and sea water by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectroscopy

Rapid Communications in Mass Spectrometry, 20(16), 2395–403

Grdisa M, Babic S, Perisa M, Carovic-Stanko K, Kolak I, Liber Z, Jug-Dujakovic M, Satovic Z, **2013**

Chemical Diversity of the Natural Populations of Dalmatian Pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium* (Trevir.) Sch.Bip.) in Croatia

Chemistry & Biodiversity, 10(3), 460–472

Grimalt S, Pozo O J, Marin J M, Sancho J V, Hernandez F, **2005**

Evaluation of different quantitative approaches for the determination of noneasily ionizable molecules by different atmospheric pressure interfaces used in liquid chromatography tandem mass spectrometry: Abamectin as case of study

Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 16(10), 1619–1630

Grob R L, Barry E F, **2004**

Modern Practice of Gas Chromatography

John Wiley & Sons, Ltd

Guillet V, Fave C, Montury M, **2009**

Microwave/SPME method to quantify pesticide residues in tomato fruits

Journal of Environmental Science and Health. Part. B, Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes, 44(5), 415–422

Gupta B, Rani M, Kumar R, **2012**

Degradation of thiram in water, soil and plants: a study by high-performance liquid chromatography

Biomedical Chromatography, 26(1), 69–75

Heise S, Weber H, Alder L, **2000**

Reasons for the decomposition of the fungicide thiram during preparation of fruit and vegetable samples and consequences for residue analysis

Fresenius Journal of Analytical Chemistry, 366(8), 851–856

Hernandez F, Beltran J, Lopez F J, Gaspar J V, **2000**

Use of Solid-Phase Microextraction for the Quantitative Determination of Herbicides in Soil and Water Samples

Analytical Chemistry, 72(10), 2313–2322

Hernandez F, Cervera M I, Portoles T, Beltran J, Pitarch E, **2013**

The role of GC-MS/MS with triple quadrupole in pesticide residue analysis in food and the environment

Analytical Methods, 5(21), 5875–5894

Hoffmann E, Stroobant V, **2002**

Mass Spectrometry. Principles and Applications

John Wiley & Sons, Ltd

Jardim A N O, Mello D C, Goes F C S, Frota E F, Caldas E D, **2014**

Pesticide residues in cashew apple, guava, kaki and peach: GC- μ ECD, GC-FPD and LC-MS/MS multiresidue method validation, analysis and cumulative acute risk assessment

Food Chemistry, 164, 195–204

Koesukwiwat U, Lehotay S J, Leepipatpiboon N, **2011**

Fast, low-pressure gas chromatography triple quadrupole tandem mass spectrometry for analysis of 150 pesticide residues in fruits and vegetables

Journal of Chromatography. A, 1218(39), 7039–7050

Kwon J W, Armbrust K L, **2006**

Degradation of chlorothalonil in irradiated water/sediment systems

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54(10), 3651–3657

Kwon, H Lehotay S J, Geis L, **2012**

Variability of matrix effects in liquid and gas chromatography-mass spectrometry analysis of pesticide residues after QuEChERS sample preparation of different food crops

Journal of Chromatography. A, 1270, 235–45

Lehotay S J, **2000**

Analysis of pesticide residues in mixed fruit and vegetable extracts by direct sample introduction/gas chromatography/tandem mass spectrometry

Journal of AOAC International, 83(3), 680–697

Lehotay S J, Maštovská K, Lightfield A R, **2005a**

Use of buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables

Journal of AOAC International, 88(2), 615–629

Lehotay S J, de Kok A, Hiemstra M, van Bodegraven P, **2005b**

Validation of a fast and easy method for the determination of residues from 229 pesticides in fruits and vegetables using gas and liquid chromatography and mass spectrometric detection

Journal of AOAC International, 88(2), 595–614

Lehotay S J, O'Neil M, Tully J, García A V, Contreras M, Mol H, Heinke V, Anspach T, Lach G, Fussell R, Mastovska K, Poulsen M E, Brown A, Hammack W, Cook J M, Alder L, Lindtner K, Gamón M, Hopper M, De Kok A, Hiemstra M, Schenck F, Williams A, Parker A, **2007**

Determination of pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate: Collaborative study

Journal of AOAC International, 90(2), 485–520

Lehotay S J, Son K A, Kwon H, Koesukwiwat U, Fu W, Mastovska K, Hoh E, Leepipatpiboon N, **2010**

Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables

Journal of Chromatography A, 1217(16), 2548–2560

Lentza C, Avramides E J, Visi E, **2001**

Determination of residues of endosulfan and five pyrethroid insecticides in virgin olive oil using gas chromatography with electron-capture detection

Journal of Chromatography A, 921(2), 297–304

Littke M H, Lepage J, Sullivan D A, Hebert V R, **2013**

Comparison of field methyl isothiocyanate flux following Pacific Northwest surface-applied and ground-incorporated fumigation practices

Pest Management Science, 69(5), 620–626

Lu C, Liu X, Dong F, Xu J, Song W, Zhang C, Li Y, Zheng Y, **2010**

Simultaneous determination of pyrethrins residues in teas by ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry

Analytica Chimica Acta, 678(1), 56–62

Malik A K, Faubel W, **1999**

Methods of analysis of dithiocarbamate pesticides: a review

Pesticide Science, 55(10), 965–970

Martínez D B, Vázquez P P, Galera M M, García M D G, **2006**

Determination of Pyrethroid Insecticides in Vegetables with Liquid Chromatography Using Detection by Electrospray Mass Spectrometry

Chromatographia, 63(9-10), 487–491

Martínez G, Plaza P, Romero R, Frenich A G, **2014**

Multiresidue method for the fast determination of pesticides in nutraceutical products (*Camellia sinensis*) by GC coupled to triple quadrupole MS

Journal of Separation Science, 37(6), 665–74

Mastovska K, Lehotay S J, **2004**

Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues

Journal of Chromatography A, 1040(2), 259–272

Matsadiq G, Hu H L, Ren H B, Zhou Y W, Liu L, Cheng J, **2011**

Quantification of multi-residue levels in peach juices, pulps and peels using dispersive liquid-liquid microextraction based on floating organic droplet coupled with gas chromatography-electron capture detection

Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 879(22), 2113–2118

McFadden W H, Schwartz H L, Evans S, **1976**

Direct analysis of liquid chromatographic effluents

Journal of Chromatography A, 122, 389–396

Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medioambiente (MAGRAMA), **2014**

Programa de cumplimiento de las buenas prácticas de laboratorio. Productos fitosanitarios y aditivos para piensos

<http://www.magrama.gob.es/agricultura/pags/fitos/registro/fichas/pdf/bpls.pdf>

Mitra S, **2003**

Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry

John Wiley & Sons, Ltd

Niessen W M A, Manini P, Andreoli R, **2006**

Matrix effects in quantitative pesticide analysis using liquid chromatography-mass spectrometry

Mass Spectrometry Reviews, 25(6), 881–99

Nieto A J, Romero, R Garrido A, **2015**

Multi-pesticide residue analysis in nutraceuticals from grape seed extracts by gas chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry

Food Control, 47, 369–380

Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), **1998**

OECD Series on principles of good laboratory practice and compliance monitoring.
Number 1. ENV/MC/CHEM(98)17

Organisation for the Economic Co-operation and Development (OECD), **2007**

Guidance document on pesticide residue analytical methods. Series on testing and assessment, number 72. Seies on pesticides. Number 39. ENV/JM/MONO(2007)17

Onduka T, Kakuno A, Kono K, Ito K, Mochida K, Fujii K, **2012**

Toxicity of chlorothalonil to marine organisms

Fisheries Science, 78(6), 1301–1308

Ou L T, Thomas J E, Allen L H, Vu J C, Dickson D W, **2006**

Effects of application methods of metam sodium and plastic covers on horizontal and vertical distributions of methyl isothiocyanate in bedded field plots

Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 51(2), 164–173

Parrilla P, Gil M D, Barranco D, Martínez M, **2005**

Application of coupled-column liquid chromatography combined with post-column photochemically induced fluorimetry derivatization and fluorescence detection to the determination of pyrethroid insecticides in vegetable samples

Analytical and Bioanalytical Chemistry, 381(6), 1217–1225

Pawliszyn J, **1997**

Solid phase microextraction : theory and practice

John Wiley & Sons, Ltd

Pawliszyn J, **2007**

Handbook of solid phase microextraction

University of Waterloo, Ontario. Ed. J Pawliszyn

Poole C F, **2003**

The Essence of Chromatography

Elsevier

Portolés T, Mol J G J, Sancho J V, López F J, Hernández F, **2014**

Validation of a qualitative screening method for pesticides in fruits and vegetables by gas chromatography quadrupole-time of flight mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization

Analytica Chimica Acta, 838, 76–85

Prestes O D, Antonio Padilla-Sanchez J, Romero-Gonzalez R, Lopez Grio S, Garrido A, Martinez-Vidal J L, **2012**

Comparison of several extraction procedures for the determination of biopesticides in soil samples by ultrahigh pressure LC-MS/MS

Journal of Separation Science, 35(7), 861–868

Regulation (EC) No 178/2002 of the European Parliament and of the Council of 28 January 2002 laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety

Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC with EEA relevance

Regulation (EC) No 889/2008 of the European Parliament and of the Council of 5 September 2008 laying down detailed rules for the implementation of Council Regulation (EC) No 834/2007 on organic production and labelling of organic products with regard to organic production, labelling and control

Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 concerning the placing of plant protection products on the market and repealing Council Directives 79/117/EEC and 91/414/EEC

Rahman M M, Park J H, Abd A M, Choi J H, Bae H R, Yang A, Park K H, Shim J H, **2013**

Single-step modified QuEChERS for determination of chlorothalonil in shallot (*Allium ascalonicum*) using GC-μ ECD and confirmation via mass spectrometry

Biomedical Chromatography, 27(4), 416–421

Ramírez A, Gallo A F, Hoyos D E, Peñuela G A, **2014**

QuEChERS GC-MS validation and monitoring of pesticide residues in different foods in the tomato classification group

Food Chemistry, 158, 153–161

Roberts T, Hutson D, **1999**

Metabolic Pathways of Agrochemicals. Part two: Insecticides and Fungicides

In First Edition; Jewess, PJ, Lee, PW, Nicholls, PH and Plimmer, JR.; The Royal Society of Chemistry. Cronwall. U.K.

Rodrigues M V N, Reyes F G R, Rehder V L G, Rath S, **2005**

An SPME-GC-MS Method for Determination of Organochlorine Pesticide Residues in Medicinal Plant Infusions

Chromatographia, 61(5-6), 291–297

Romero Gonzalez R, Garrido Frenich A, Martinez-Vidal J L, Prestes O D, Grio S L, **2011**

Simultaneous determination of pesticides, biopesticides and mycotoxins in organic products applying a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction procedure and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

Journal of chromatography.A, 1218(11), 1477–1485

Ruiz I, Morales A, Oliva J, Barba A, **2011**

Validation of an analytical method for the quantification of pyrethrins on lemons and apricots using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry

Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes, 46(6), 530–534

Sanon A, Garba M, Auger J, Huignard J, **2002**

Analysis of the insecticidal activity of methylisothiocyanate on *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera : Bruchidae) and its parasitoid *Dinarmus basalis* (Rondani) (Hymenoptera : Pteromalidae)

Journal of Stored Products Research, 38(2), 129–138

Serrano E, Beltran J, Hernandez F, **2009**

Application of multiple headspace-solid-phase microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry to quantitative analysis of tomato aroma components

Journal of Chromatography A, 1216(1), 127–133

Sharma V K, Aulakh J S, Malik A K, **2003**

Thiram: degradation, applications and analytical methods

Journal of Environmental Monitoring, 5(5), 717–723

Silva É A S, Lopez V, Pawliszyn J, **2013**

Fast and robust direct immersion solid phase microextraction coupled with gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry method employing a matrix compatible fiber for determination of triazole fungicides in fruits

Journal of Chromatography A, 1313, 139–146

Simpson C R, Nelson S D, Stratmann J E, Ajwa H A, **2010**

Surface water seal application to minimize volatilization loss of methyl isothiocyanate from soil columns

Pest Management Science, 66(6), 686–692

Scott R P W, Scott C G, Munroe M, Hess J, **1974**

Interface for on-line liquid chromatography—mass spectroscopy analysis

Journal of Chromatography A, 99, 395–405

Snyder L R, Kirkland J J, Dolan J W, **2009**

Introduction to modern liquid chromatography

John Wiley & Sons, Ltd

Stiles C L, Sams C E, Robinson D K, Coffey D L, Mueller T C, **2000**

Influence of metam sodium on the dissipation and residual biological activity of the herbicides EPTC and pebulate in surface soil under black plastic mulch

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48(10), 4681–4686

Szolar O H J, **2007**

Environmental and pharmaceutical analysis of dithiocarbamates

Analytica Chimica Acta, 582(2), 191–200

Tena M T, Carrillo J D, 2007

Multiple solid-phase microextraction: Theory and applications

Trac-Trends in Analytical Chemistry, 26(3), 206–214

Theocharopoulos S P, Wagner G, Sprengart J, Mohr M E, Desaulles A, Muntau H, Cristou M, Quevauviller P, **2001**

European soil sampling guidelines for soil pollution studies. *Science of the Total Environment*, 264(1-2), 51–62

Thurman E M, Ferrer I, Barceló D, **2001**

Choosing between Atmospheric Pressure Chemical Ionization and Electrospray Ionization Interfaces for the HPLC/MS Analysis of Pesticides

Analytical Chemistry, 73(22), 5441–5449

Tomlin C D S, **1997**

The Pesticide Manual

British Crop Protection Council: Farnham. U.K. 227-229

Triky S, Austerweil M, Steiner B, Peretz Y, Katan J, Gamliel A, **2007**

Generation and dissipation of methyl isothiocyanate in soils following metam sodium fumigation: Impact on verticillium control and potato yield

Plant Disease, 91(5), 497–503

Triky S, Austerweil M, Steiner B, Peretz Y, Katan J, Gamliel A, **2009**

Accelerated Degradation of Metam-Sodium in Soil and Consequences for Root-Disease Management

Phytopathology, 99(4), 362–368

Viñas P, Campillo N, Martínez N, Hernández M, **2009**

Solid-phase microextraction on-fiber derivatization for the analysis of some polyphenols in wine and grapes using gas chromatography-mass spectrometry

Journal of Chromatography. A, 1216(9), 1279–1284

Volante M, Pontello M, Valoti L, Cattaneo M, Bianchi M, Colzani L, **2000**

Application of Solid Phase Micro-Extraction (SPME) to the analysis of pesticide residues in vegetables

Pest Management Science, 56(7), 618–636

Vryzas Z, Papadakis E N, Papadopoulou-Mourkidou E, **2002**

Microwave-assisted extraction (MAE)-acid hydrolysis of dithiocarbamates for trace analysis in tobacco and peaches

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50(8), 2220–2226

Walorczyk S, Drozdzyński D, Gnusowski B, **2011a**

Multiresidue determination of 160 pesticides in wines employing mixed-mode dispersive-solid phase extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry

Talanta, 85(4), 1856–1870

Walorczyk S, Drozdzyński D, **2011b**

Development and Validation of a Routine Multiresidue Method for Determining 140 Pesticides in Fruits and Vegetables by Gas Chromatography/Tandem Quadrupole Mass Spectrometry

Journal of AOAC International, 94(5), 1625–1642

Walorczyk S, **2014**

Validation and use of a QuEChERS-based gas chromatographic-tandem mass spectrometric method for multiresidue pesticide analysis in blackcurrants including studies of matrix effects and estimation of measurement uncertainty

Talanta, 120, 106–113

Wang D, Juzwik J, Fraedrich S W, Spokas K, Zhang Y, Koskinen W C, **2005**

Atmospheric emissions of methyl isothiocyanate and chloropicrin following soil fumigation and surface containment treatment in bare-root forest nurseries

Canadian Journal of Forest Research, 35(5), 1202–1212

Wennrich L, Popp P, Breuste J, **2001**

Determination of organochlorine pesticides and chlorobenzenes in fruit and vegetables using subcritical water extraction combined with sorptive enrichment and CGC-MS

Chromatographia, 53(S1), S380-S386

Willoughby R C, Browner R F, **1984**

Monodisperse aerosol generation interface for combining liquid chromatography with mass spectroscopy

Analytical Chemistry, 56(14), 2626–2631

Wong J W, Zhang K, Tech K, Hayward D G, Krynitsky A J, Cassias I, Schenck F J, Banerjee K, Dasgupta S, Brown D, **2010a**

Multiresidue Pesticide Analysis of Ginseng Powders Using Acetonitrile- or Acetone-Based Extraction, Solid-Phase Extraction Cleanup, and Gas Chromatography-Mass Spectrometry/Selective Ion Monitoring (GC-MS/SIM) or -Tandem Mass Spectrometry (GC-MS/MS)

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58(10), 5884–5896

Wong J W, Zhang K, Tech K, Hayward D G, Makovi C M, Krynitsky A J, Schenck F J, Banerjee K, Dasgupta S, Brown D, **2010b**

Multiresidue pesticide analysis in fresh produce by capillary gas chromatography-mass spectrometry/selective ion monitoring (GC-MS/SIM) and -tandem mass spectrometry (GC-MS/MS)

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58(10), 5868–5883

Woodrow J E, Seiber J N, LeNoir J S, Krieger R I, **2008**

Determination of methyl isothiocyanate in air downwind of fields treated with metam-sodium by subsurface drip irrigation

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56(16), 7373–7378

Woudneh M B, Oros D R, **2006**

Quantitative determination of pyrethroids, pyrethrins, and piperonyl butoxide in surface water by high-resolution gas chromatography/high-resolution mass spectrometry

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54(19), 6957–6962

Wu X, Yin Y, Wang S, Yu Y, **2014**

Accumulation of chlorothalonil and its metabolite, 4-hydroxychlorothalonil, in soil after repeated applications and its effects on soil microbial activities under greenhouse conditions

Environmental Science and Pollution Research, 21(5), 3452–3459

Zhang Y, Spokas K, Wang D, **2005**

Degradation of methyl isothiocyanate and chloropicrin in forest nursery soils

Journal of Environmental Quality, 34(5), 1566–1572

Zhang Y, Wang X, Lin C, Fang G, Wang S, **2012**

A Novel SPME Fiber Chemically Linked with 1-Vinyl-3-hexadecylimidazolium hexafluorophosphate Ionic Liquid Coupled with GC for the Simultaneous Determination of Pyrethroids in Vegetables

Chromatographia, 75(13-14), 789–797

Zhang Y, Zhang X, Jiao B, **2014**

Determination of ten pyrethroids in various fruit juices: comparison of dispersive liquid-liquid microextraction sample preparation and QuEChERS method combined with dispersive liquid-liquid microextraction

Food Chemistry, 159, 367–373

CAPITULO 6

CONCLUSIONES GENERALES

A partir del trabajo realizado en esta tesis se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. El acoplamiento cromatografía (líquida y de gases) con espectrometría de masas en tándem utilizando analizador de triple cuadrupolo constituye una herramienta analítica muy poderosa para la determinación de residuos de plaguicidas en muestras alimentarias y medioambientales. La elevada selectividad y sensibilidad de los métodos desarrollados permiten monitorizar la presencia de residuos de analitos preseleccionados y determinar cuantitativamente sus niveles de concentración.
2. Casi todos los compuestos investigados en esta Tesis Doctoral son problemáticos desde el punto de vista analítico. En la mayoría de los casos, se han desarrollado nuevos métodos que superan con creces las características de los escasos métodos existentes. En el presente trabajo, las técnicas GC-MS/MS y LC-MS/MS han permitido alcanzar la sensibilidad requerida y validar las metodologías desarrolladas de acuerdo con la legislación vigente en lo referente a vigilancia y cumplimiento de LMR.
3. La metodología desarrollada para la determinación de piretroides, basada en SPME-GC-MS, resulta adecuada para la monitorización de residuos de estos insecticidas en muestras vegetales (tomate y fresa). Además de la detección de los compuestos a bajas concentraciones, se ha hecho un estudio preliminar de las posibilidades cuantitativas del método con resultados prometedores.
4. Se ha desarrollado una metodología basada en GC-MS/MS que permite la determinación de clorotalonil en muestras vegetales. La etapa de preparación de

muestra ha sido crítica, pero con el procedimiento optimizado se ha conseguido minimizar las pérdidas de analito obteniendo resultados cuantitativos satisfactorios en todas las matrices estudiadas.

5. Haciendo uso de la técnica de extracción HS-SPME, seguida de GC-MS/MS, se ha desarrollado un método sencillo, rápido, sensible y robusto para la determinación de MITC en muestras medioambientales (agua y suelo). En este caso particular, la aproximación MHS-SPME no ha resultado adecuada para la cuantificación de las muestras utilizando calibración en solvente.
6. Se ha desarrollado metodología moderna basada en LC-MS/MS para la determinación específica de tiram en muestras vegetales, fungicida ditiocarbamato para el que apenas existen métodos analíticos disponibles en la bibliografía. Al igual que en caso del clorotalonil, el cuidadoso diseño de la etapa de preparación de muestra ha permitido evitar pérdidas y obtener resultados satisfactorios en las matrices estudiadas, a pesar de tratarse de un compuesto muy problemático desde el punto de vista analítico.
7. Se ha desarrollado un método simple y específico para la determinación individual de piretrinas en diversas matrices vegetales, cubriendo los grupos de alimentos que establece la legislación europea (alto contenido en agua, alta acidez, alto contenido en almidón, alto contenido en grasa, y matrices secas). La sensibilidad alcanzada con el método desarrollado permite su aplicación para la vigilancia del cumplimiento de los LMR.
8. En el análisis de piretrinas, la comparación entre las interfases de ESI y APCI en matrices con alto contenido en grasa, ha demostrado que APCI se ve menos

afectada por los componentes de la matriz, resultando más adecuada para este tipo de muestras, aunque presenta menor sensibilidad que la interfase ESI.

9. En todos los casos considerados en la Tesis, se ha demostrado la importancia de adquirir al menos dos transiciones SRM en los métodos MS/MS desarrollados, con el fin de confirmar la identidad del compuesto detectado en las muestras mediante el cálculo de la relación Q/q y su desviación con respecto al patrón de referencia.

CHAPTER 6

GENERAL CONCLUSIONS

As a result of the research work performed in this Doctoral Thesis, the following conclusions can be reached:

1. Chromatography (GC and LC) coupled to tandem mass spectrometry (QqQ) is one of the most powerful techniques for pesticide residue determination in food and environmental samples. The excellent selectivity and sensitivity achieved in developed methods allow the monitoring and quantification of pre-selected analytes at very low concentration levels.
2. Most of investigated compounds are considered problematic from an analytical point of view. In their majority, developed methods clearly improve analytical characteristics of existent methodology. In this Thesis, the use of GC-MS/MS and LC-MS/MS has allowed to reach the sensitivity needed to validate the developed methodologies in agreement with current legislation, what concerns vigilance and MRL fulfilment.
3. Developed methodology for pyrethroid determination, based on SPME-GC-MS, is adequate for monitoring their presence in fruit and vegetable samples (strawberry and tomato). Besides the detection of the compounds at low concentrations levels, a preliminary study of the quantitative possibilities of the method has been done with promising results.
4. Methodology for chlorothalonil determination in fruit and vegetable samples based on GC-MS/MS has been developed. Sample preparation stage has been critical, and thus, with the optimized procedure, analyte losses have been minimized, so satisfactory results have been obtained in all studied matrices.

5. Using the HS-SPME technique followed by GC-MS/MS, a simple, rapid, sensitive and robust method for MITC determination in environmental samples (water and soil) has been developed. In this particular case, the approximation MHS-SPME proved not adequate for sample quantification by using external standard solvent calibration.
6. Modern methodology based on LC-MS/MS has been developed for the specific determination of thiram in vegetable samples, taking into account that only few methods have been published for this dithiocarbamate fungicide. As in the case of chlorothalonil, sample preparation stage has been studied carefully, in order to minimize analyte losses, and satisfactory results have been obtained for all studied matrices, despite being a problematic compound from an analytical point of view.
7. A simple and specific method has been developed for individual pyrethrin determination in several fruit and vegetable samples, different matrix groups listed in EU legislation have been considered (high water content, high oil content, high acid content, high starch content and dry matrices). Sensitivity achieved in developed methodology allows its application for the vigilance of the fulfilment of the MRLs.
8. In pyrethrins determination, a comparison between ESI and APCI interfases, in the case of high oil content matrices, has demonstrated that APCI interfase is less affected by matrix components, so it can be considered more suitable for this kind of samples, although sensitivity of ESI interfase is higher.

9. It has been shown the importance of acquiring at least two SRM transitions in MS/MS developed methods, in order to confirm the identity of detected compounds in samples by the calculation of the Q/q ratio and its deviation from the standard reference.

SUGERENCIAS PARA FUTUROS TRABAJOS

En esta Tesis Doctoral se ha investigado el potencial del acoplamiento cromatografía de gases y de líquidos con espectrometría de masas, usando analizador de triple cuadrupolo, para la determinación de residuos de plaguicidas en matrices de alimentos y medioambientales. A la vista de los resultados obtenidos, se pueden proponer diversos trabajos de interés para un futuro próximo:

1. Continuar con el desarrollo y validación de métodos analíticos basados en GC-MS/MS y LC-MS/MS QqQ bajo el sistema de calidad BPL, muchos de los cuales corresponderán a combinaciones analito/matriz que no han sido estudiadas con anterioridad.
2. Desarrollo de metodología multirresidual para plaguicidas basada en el uso complementario de GC-MS/MS y LC-MS/MS, en donde se pueda incluir un buen número de compuestos de muy diferentes polaridades, volatilidades y grado de estabilidad térmica.
3. Profundizar en las aplicaciones de metodología múltiple SPME en modo espacio de cabeza (HS) e inmersión directa (DI), con la finalidad de explorar la capacidad cuantitativa de la dicha técnica
4. Participar en un proyecto de determinación de compuestos volátiles en aceite mediante purga y trampa seguida de GC-MS/MS para el diseño de un modelo de clasificación de aceites de oliva en función de su calidad (aceite de oliva virgen extra, aceite de oliva virgen,...).

5. Participar en el desarrollo y validación de métodos basados en GC-APCI-MS/MS (QqQ) para la determinación de contaminantes orgánicos persistentes (POP's) en colaboración con el CSIC de Barcelona.



UNIVERSITAT
JAUME·I



UNIVERSITAT
JAUME·I